水稻低分子量 GTP 结合蛋白基因 *osRACD* 的分离

米志勇 王树生* 吴乃虎†

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080. * 北京大学生命科学学院硕士研究生. † 联系人, Email: nhwu@public3.bta.net.cn)

摘要 应用改良的 mRNA 差别显示技术, 从农垦 58S 水稻中, 获得了一条与光周期育性转换性状相关的差异表达片段 RDP-8. 同源性比较表明, 该片段与玉米低分子量 GTP 结合蛋白基因之间存在着很高的序列同源性. 进一步应用 RDP-8 片段为探针, 筛选长日照光周期处理的水稻农垦 58N 幼穗 cDNA 文库. 经 DNA 序列分析和同源性比较证实, 所得的阳性克隆含有水稻低分子量 GTP 结合蛋白编码基因 *osRACD* 的全长 cDNA 序列. 它与玉米 *RACD* 基因相比, 核苷酸序列同源性为 88%, 氨基酸同源性达 97%, 是一种水稻 Rac 亚类低分子量 GTP 结合蛋白编码基因. RT-PCR 分析结果表明, 该基因与光敏核不育水稻光周期育性转换性状密切相关.

关键词 水稻 *osRACD* mRNA 差别显示 信号传导

光敏核不育水稻农垦 58S 自然不育株是石明松于 1973 年发现的^[1]. 由于这种水稻具有长日照下不育和短日照下可育的光周期育性转换特性, 因此为农业生产中按“两系法”途径利用水稻杂种优势提供了可行性, 受到了科学工作者的重视^[2]. 在基础理论研究方面, 有关光敏核不育水稻的遗传基础、光温生态、生理生化、育种栽培及有关基因的染色体定位等, 都已取得了相当大的进展^[3-6]. 但迄今为止还没有分离到水稻光敏核不育基因.

美国 Dena-Farbe 癌症研究所的 Liang 和 Pardee 建立的 mRNA 差别显示技术, 可以从一对细胞群体或一对基因型各自产生的约 15 000 种 mRNA 分子中, 有效地鉴定并分离出差别表达的基因^[7, 8]. 由于农垦 58S 光周期育性转换既涉及到环境光温的影响, 也涉及到光信号传导的途径及其与光敏核不育基因之间相互作用的分子机理, 特别是与植株自身的发育状态密

切相关. 我们认为, mRNA 差别显示技术对水稻光敏核不育基因的分离具有独特的优越性.

光敏核不育水稻农垦 58S 接收光周期信号的器官是叶片, 产生光周期反应的器官主要是幼穗中的花药, 光周期育性转换敏感期是小孢子尚未发生的二次枝梗和颖花原基分化期(第Ⅲ期)到花粉母细胞形成期(第Ⅴ期)^[9]. 因此, 研究经不同光周期处理的水稻育性转换敏感期幼穗基因表达活性的差异, 有可能揭示光信号传导途径中参与控制光周期育性转换的相关基因. 本研究应用我们优化的 mRNA 差别显示技术体系, 分析了经不同光周期处理的农垦 58S 和农垦 58N 的基因表达状况, 获得一个可能与光敏核不育水稻光周期育性转换性状相关的基因.

1 材料与方法

(i) 试验材料. 水稻(*Oryza sativa* L)为正常晚粳农垦 58N 品种及其光敏核不育的自交突变体农垦 58S, 由湖北省农业科学院牟同敏教授赠送. 按常规方法浸种, 催芽, 播种, 当幼苗在 26℃室温下长到 5 叶期后, 作 9 h 短日照(SD)处理, 诱导幼穗分化至二次枝梗及颖花原基分化期(第Ⅲ期). 然后将植株分为两组, 一组仍在 SD 下生长, 日最低气温约为 26.5℃; 另一组转入长日照(LD, 10 h 自然光 + 4 h 补充光照)处理(6 只白炽灯, 每只 60 W), 日最低温度为 26.5℃. 至雌雄蕊形成中期(第Ⅳ期)第 2 天, 取不同光照条件下的主茎幼穗, 供提取总 RNA 使用. 不同处理的材料分别以 58S-LD, 58S-SD 和 58N-LD, 58N-SD 表示.

(ii) 化学试剂与酶制剂. DNase I, 禽源逆转录酶 AMV 及 Prime-a-Gene Labeling System 均购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶购自 Sangon 公司; 放射性同位素(α -³²P)dATP(比活性 3000×3.7×10¹⁰ Bq/mmol)购自亚辉公司; RNAimage 试剂盒购自 GenHunter 公司. 其他药品均为国产分析纯.

(iii) 总 RNA 的提取. 按照本实验室改良的异硫氰酸胍-酚法提取光敏核不育水稻幼穗组织的总 RNA^[8]. 参照 Sambrook 等人^[10]的方法进行 RNA 甲醛变性凝胶电泳以确认 RNA 的完整性, 然后在 5 μ g 总 RNA 中加入适量的 DNase I 以消除污染的 DNA.

(iv) cDNA 第 1 链的合成. 参照 RNAimage 试剂盒提供的方法略加修改. 取经 DNase I 处理的总 RNA, 以 H-T₁₁A, H-T₁₁C 和 H-T₁₁G 作 mRNA 3' -末端的锚定引物, 加 SuperScriptTM II 逆转录酶分别合成 58S-LD, 58S-SD 及 58N-LD 3 组材料的第 1 链 cDNA. 反应混合物含 1.5 μ g 总 RNA, H-T₁₁M(2 μ mol/L) 10 μ L, 5×第 1 链缓冲液 12 μ L, 0.1 mol/L DTT 6 μ L, dNTPs (250 μ mol/L) 4.8 μ L, RNasin 40 U, SuperScriptTM II 逆转录酶 600 U, 补加无菌水至终体积为 60 μ L. 反应混合物于 42℃水浴中保温 50 min 后转移到 70℃水浴中作热处理 15 min, 使逆转录酶失活以终止反应, 每 2 μ L 分装一管, -20℃保存备用.

(v) mRNA 差别显示反应. 参照 RNAimage 试剂盒提供的方法略加修改. 20 μ L PCR 反应混合物中含 10×缓冲液 2 μ L, dNTPs (25 μ mol/L) 1.6 μ L, H-T₁₁M(2 μ mol/L) 2 μ L, 随机引物 (2 μ mol/L) 2 μ L, cDNA 第 1 链反应产物 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 U, (α -³²P)dATP(比活性 3 000×3.7×10¹⁰ Bq/mmol) 0.2 μ L. 样品经 94℃变性 5 min 后, 按 94℃, 1 min→40℃, 2 min→72℃, 1.5 min 程序共作 40 次循环, 进行 PCR 扩增.

(vi) cDNA 文库的构建. 根据本试验室改良的方法以晚粳品种农垦 58N 的雌雄蕊形成中期(第Ⅳ期)的幼穗为材料, 提取 mRNA, 构建 cDNA 文库, 并筛选目的基因的全长 cDNA 序列^[11].

(vii) RT-PCR 定量检测. 参照 BRL 公司 SuperScriptTM II 试剂盒提供的方法, 利用 Oligo

(dT)₁₂₋₁₈ 对总 RNA 样品作逆转录反应. 分别合成水稻泛素基因 *RUBQ2*(GenBank 注册序号为 AF184280)5' -末端特异引物: 5' -GGCAAGACCATCACCTTGAGG-3', 和 3' -末端特异引物: 5' - GTGGACTCCTTCTGGATGTTGTA-3', 进行 RT-PCR 扩增. RT-PCR 反应体系参照 Sambrook 等人的方法^[10], 条件为 95℃变性 5 min 后, 按 94℃, 1 min→60℃, 0.5 min→72℃, 0.5 min 程序进行 20 次循环. 所得扩增产物加样在 1% 琼脂糖凝胶上作电泳分离, 用 Bio-Rad GEL-DOC2000 凝胶成像分析仪检测条带亮度, 确定反转录样品之间 cDNA 量的比例. 根据水稻 *osRACD* 5' UTR 和 3' UTR 序列结构, 分别合成 *osRACD* 基因的 5' -末端引物: 5' -CGATCTGCA-CTGCACTGTCTACC-3' 和 3' -末端引物: 5' -GCTGGCTGTGCTGAGTGAGAGTA-3', 对反转录产物进行 RT-PCR 定量扩增. 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 原位转移到 NC 膜上, 利用同位素标记的 *osRACD* 探针进行 Southern 杂交分析.

2 实验结果

2.1 不同光照条件下农垦 58S 和农垦 58N 的自交结实率检测

为了验证农垦 58S 的种子纯度, 以及在北京的自然条件下, 采用本实验室的光照处理装置, 该品种是否依然具有光周期育性转换的特性, 设立了以晚粳农垦 58N 为育性对照品系, 对不同光照处理的材料作了自交结实率检测. 其方法是在收集用于 RNA 提取的幼穗样品后, 将所剩余的水稻植株继续种植到开花结实期, 然后套袋以便统计其自交结实率的数据. 实验结果显示, 农垦 58S 经长日照处理的 3 批材料的结实率均为零, 经短日照处理的 3 批材料平均结实率则在 55% 以上; 而对照材料农垦 58N, 无论长日照还是短日照处理, 结实率均在 90% 左右(表 1). 这说明, 在北京地区和本实验室采用的光照条件下, 农垦 58S 水稻仍具有明显的光周期育性转换特性.

表 1 光敏核不育水稻在长日照处理和短日照处理条件下的结实率统计

种植批次	品系	长日处理(14 h)		短日处理(9 h)	
		株数	套袋自交结实率	株数	套袋自交结实率
第 1 批	农垦 58S	10	0	10	55%
	农垦 58N	10	90%	10	85%
第 2 批	农垦 58S	10	0	10	56%
	农垦 58N	10	94%	10	91%
第 3 批	农垦 58S	10	0	10	56%
	农垦 58N	10	97%	10	88%
平均值	农垦 58S		0		55.6%
	农垦 58N		93.6%		88%

2.2 光敏核不育水稻光周期育性转换相关基因 cDNA 片段 RDP-8 的分离

采用本实验室改良的异硫氰酸胍-酚法, 分别提取经长、短日照两种不同光周期处理的农垦 58S 和经长日照光周期处理的农垦 58N 雌雄蕊形成中期(第Ⅳ期)幼穗组织的总 RNA. 为便于讨论, 将这 3 组材料分别命名为 58S-LD RNA, 58S-SD RNA 及 58N-LD RNA. 一般每克鲜重组织可得到 500~800 μg RNA, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值接近于 2.0. 总 RNA 经甲醛变性凝胶电泳和 EB 染色后置紫外光下观察, 25S rRNA 和 18S rRNA 的条带清晰明亮, 而 5S rRNA 条带则几乎难以辨认, 且 25S rRNA 和 18S rRNA 含量之比约为 2 : 1(图未示出). 这说明总 RNA 分子完整

性良好, 适合于 DDRT-PCR 反应.

从 3 种材料提取的总 RNA 样品经分光光度计准确定量后, 分别用做合成第 1 链 cDNA 的底物. 选用 GenHunter 公司 RNAimage 试剂盒中的 12 条长度为 13 个碱基的随机引物(H-AP8~H-AP20), 与 3 条锚定引物(H-T₁₁A, H-T₁₁C, H-T₁₁G)匹配成 36 对引物组合, 对 58S-LD, 58S-SD 及 58N-LD 3 种材料的 mRNA 作差别显示分析. 结果表明, 不同引物对之间, 在扩增的 cDNA 条带数量和信号强度两方面均存在着差别, 一般每引物对可扩增出 60~120 条 cDNA 片段, 其分子量大小的范围为 100~600 bp. 光敏核不育水稻农垦 58S 和正常晚粳农垦 58N 之间, mRNA 差别显示带型基本一致, 反映出两者的遗传背景差异甚少.

由 H-AP13/H-T₁₁A 引物对扩增的条带中, 存在一条在可育材料农垦 58S-SD 和农垦 58N-LD 中扩增水平相同, 而在不育材料农垦 58S-LD 中扩增水平明显下降的差异片段 RDP-8(图 1). 将此片段作二次扩增鉴定后, 克隆到 PGEM-T 载体上, 进行 DNA 序列测定. 如图 2 所示, 该片段的 5' - 末端具有 H-AP13 随机引物序列, 而 3' - 末端则存在着 H-T₁₁A 锚定引物序列, 两者之间共有 274 个碱基. DNA 同源性检索指出, 在 RDP-8 片段中, 从 5' - 末端开始至终止密码子 TAA 止的这一段共 143 个核苷酸长的序列, 与玉米低分子量 GTP 结合蛋白基因 *RACD* 相应区段比较, 核苷酸序列的同源性为 83%, 氨基酸序列的同源性为 93%,

图 1 由 H-AP13/H-T₁₁A 引物对扩增的差别显示条带
1—— 农垦 58N-LD, 2——农垦 58S-LD, 3—— 农垦 58S-SD. 箭头所示为特异片段 RDP-8

水稻 RDP-8	5' AAGCT	TCGGCATA	CA	TTGAATGCAG	TTCAAAAACA	CAGCAAAACA	60
	***	* * *	***	* *	*****	*****	***
玉米 <i>RACD</i> 基因	5' GGTGCT	GCCGCCTACA	TCGAATGCAG	TTCAAAAATC	CAGCAGAACA		
							120
TCAAGGCAGT	TTTCGATGCT	GCGATTAAAG	TGGTTCTCCA	GCCTCCAAAG	CAAAAAGAAGA		
* * *	***	* * *	* *	*****	***	*****	*****
TAAAAGCAGT	GTTTGACGCA	GCAATTAAAG	TGGTTCTCCA	GCCACCAAAG	CAAAAAGAAGA		
							180
AGAAGAAAAA	GGCGCAGAAA	GGATGTGCCA	TCTTGTAAAT	A--AATGGTA	GA-----CA		
*****	* * *	***	*****	* *	* * *	* *	***
GGAAGAAGAA	GGTGCAAGAAG	GGATGCACCA	TTTTGTAACT	ACAAACGGTA	GAGGGCAACA		
							240
GTGCAG-TGC	AGATCGATGT	ATCCCTTCAT	--TTGTAGCC	TCTGGCTTCA	ATCGTCGCTT		
* * *	***	* * *	* * *	* *	* *	* *	* *
GTCTGGCTGC	GG--CGCTGC	TGCCAATGAT	AACCATCGCC	TCCTTGCTGT	ATAATATATC		
							300
GTTTGTATAA	TTACGCTAG-	ATGCCACCGG	CAGAAGAT-A	TAATATAGTC	CTCCTGCCTT		
* * *	***	* * *	*****	* *	* * *	* * *	
GCCTG-ATCA	TGCCACCAGC	ATGCACAAGG	GAGATGGTGG	TTTTAGGATC	CTTGTCCTAC		
TGTGGTGTG	GTCTCTAAAA	AAAAAAGCT	T	3'			
****	***						
TGTGTTGTGT	AGACCACCGG	GTGTAGTTGA	C	3'			

图 2 RDP-8 核苷酸序列同玉米低分子量 GTP 结合蛋白基因 *RACD* 相应区段的比较

下划线序列分别示 H-AP13 和 H-T₁₁A 引物, 框内碱基为终止密码子

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-19-2047>

并在相同部位具有同样的终止密码子. 据此判断, RDP-8 片段可能是与光敏核不育水稻光周期育性转换相关基因的部分 cDNA 序列.

2.3 光敏核不育水稻光周期育性转换相关基因 *osRACD* 编码区核苷酸序列结构

按照我们改良的方法^[11], 取水稻晚粳品种农垦 58N 雌雄蕊形成中期(第Ⅳ期)幼穗构建 cDNA 文库. 然后用同位素 ³²P 标记的 RDP-8 DNA 片段为探针进行筛选, 获得阳性噬菌斑. 其插入片段根据 Sanger 双脱氧链终止法进行核苷酸序列测定. 从图 3 所示的核苷酸序列结构中可以看到, 这个阳性克隆的插入序列含有一个长度为 594 bp 的 RDP-8 可读框, 编码 197 个氨基酸和 1 个终止密码子.

```
5' AGCAAGCAGCAGCTGAGGTGAGGTCCGTGGCGTTGGAGTGAGGACTGAGGAGGAAGAAGA
*****
GGGCGGGATCTAGGGTACCGGATGCGCTGGCTGTGCTGAGTGAGAGTAGAGATGAGCGCG
***** M S A
TCTCGGTTTCATCAAGTGCCTCACCGTGGGGGACGGCGCCGTGGGCAAGACCTGCATGCTC
S R F I K C V T V G D G A V G K W I P E
ATCTCTACACCTCCAACACCTTCCCCACGGACTATGTTCCAAGTGTTCCTGATACTTC
I S Y T S N T F P T D Y V P T V F D N F
AGTGCAAAATGTTGTGGTTCGATGGGAGCACTGTGAAGTGGGGTGTGGGATACAGCAGGA
S A N V V V D G S T V N L G L W D T A G
CAAGAGGACTACAATAGGCTACGCCCGTTGAGCTATCGTGGCGCTGATGTTTCCTGCTG
Q E D Y N R L R P L S Y R G A D V F L L
GCCTTTTCTCTGATCAGCAAAGCAAGCTATGAGAATGTTTCTAAAAAGTGGATACCTGAA
A F S L I S K A S Y E N V S K W I P E
TTAAGGCATTATGCTCTCGGTGTGCCAATAATTCTCGTTGGAACAAAGCTTGATCTGCGG
L R H Y A P G V P I I L V G T K L D L R
GATGATAAGCAATTTTCGTAGATCACCTGGTGTGTACCTATTTCCACTGCTCAGGGC
D D K Q F F V D H P G A V P I S T A Q G
GAAGAGCTGAGGAACTCATTGGTGCAGCGGCATACATTGAATGCATGTTCAAAAACACAG
E E L R K L I G A A A Y I E C S S K T Q
CAAAACATCAAGGCAGTTTTCGATGCTGCGATTAAGGTGGTTCTCCAGCCTCCAAAGCAA
Q N I K A V F D A A I K V V L Q P P K Q
AAGAAGAAGAAAAGGCGCAGAAAGGATGTGCCATCTGTGAATTAATGGTAGACAG
K K K K K K A Q K G C A I L * *****
TGCAGTGCAGATCGATGATCCCTTCATTGTAGCCTCTGGCTTCAATCGTCGCTTGTTC
*****
GTATAATTACGTTAGATGCCACCGCAGAAGATATAATAGTCCCTCTGCCTTTGTGGT
*****
GTTGGTCTCT 3'
*****
```

图 3 水稻 *osRACD* 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

通过在 GenBank, EMBL 和 DDBJ 等数据库的查寻, 发现这个可读框与玉米低分子量 GTP 结合蛋白基因 *RACD* 相比, 核苷酸序列同源性的 88%, 氨基酸序列同源性的 97%, 但未找到任何与之同源的已发表的水稻基因序列. 据此我们推断, RDP-8 可读框编码着水稻低分子量 GTP 结合蛋白基因的全长 cDNA 序列, 是首次分离的一种可能与光敏核不育水稻育性转换相关的基因, 命名为 *osRACD*.

除了水稻以外, 不同的研究者已先后从玉米、油菜、烟草、拟南芥^[12]及睡莲^[13]等多种植物中分离到了 Rac 亚类低分子量 GTP 结合蛋白基因, 并完成了相应的核苷酸序列的测定. 从表 2 所列的数据可以看到, 水稻的 *osRACD* 基因同其他植物相比, 无论是基因的核苷酸序列还是编码蛋白质的氨基酸序列, 都具有高度的同源性. 而其中与单子叶植物玉米的同源性程度又明显地高于与其他双子叶植物之间的同源性水平. 这说明不同物种之间, 特别是单子叶

植物之间 Rac 亚类基因具有高度的保守性. 此外我们还对表 2 所列的 10 种不同植物来源的 Rac 亚类基因的核糖体结合位点作了结构分析, 发现它们均不具备典型的 Kozak 序列特征. 这反映出植物低分子量 GTP 结合蛋白基因可能具有其独特的翻译机制.

表 2 水稻及其他植物 Rac 亚类低分子量 GTP 结合蛋白基因之间的同源性比较

植物	同源基因	5'UTR 长度/bp	Kozak 序列	CDS		3'UTR 长度/bp	氨基酸同源性
				长度/bp	同源性		
水稻	<i>osRACD</i>	111	AGAGATGAG	591		148	
玉米	<i>RACD</i>	175	ACCGATGAG	591	88.9%	270	97.5%
油菜	<i>Brac1</i>	58	AGAGATGAG	594	77.9%	271	90.9%
烟草	<i>rac</i>	48	AAAAATGAG	591	79.3%	161	92.2%
烟草	<i>NTGP3</i>	88	TAGAATGAG	594	80.4%	323	92.9%
拟南芥	<i>Rop6</i>	184	AAAGATGAG	594	79.9%	187	91.9%
拟南芥	<i>Rho1Ps</i>	145	AAAGATGAG	594	79.7%	208	91.4%
烟草	<i>rop1</i>	43	AAAAATGAG	591	77.9%	296	91.4%
烟草	<i>NTGP2</i>	192	AAAAATGAG	591	77.9%	280	92.2%
睡莲	<i>rac1</i>	267	GGAAATGAG	591	78.8%	291	92.9%
拟南芥	<i>ARAC3</i>	193	AAAGATGAG	594	72.2%	193	86.9%

2.4 *osRACD* 基因表达与光周期育性转换之间的相关性分析

为了验证水稻 *osRACD* 基因表达活性与光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换性状之间的相关性, 有必要应用 RT-PCR 定量分析法, 从 RNA 转录本水平上检测在 58S-LD 和 58S-SD 两组材料中, *osRACD* 基因的表达状况. 本研究以组成型表达的水稻泛素基因 *rubq2* 的 RT-PCR 扩增产物之凝胶电泳结果作参照, 确定 58N-LD, 58S-LD 和 58S-SD 3 种材料总 RNA 反转录产物的取样量(图 4). 利用合成的水稻 *osRACD* 基因 5' UTR 特异引物和 3' UTR 特异引物组成引物对, 对这 3 种材料 *osRACD* 基因的表达状况作 RT-PCR 定量分析. 结果表明在可育材料 58N-LD 和 58S-SD 样品中存在着明显的阳性扩增条带, 而在不育材料 58S-LD 样品中则不存在相应的扩增条带(图 5). 进而我们又以 *osRACD* 基因 cDNA 编码序列为探针, 对这些

图 4 水稻泛素基因 RUBQ2 的 RT-PCR 定量分析
1, 2——农垦 58N-LD 幼穗 cDNA; 3, 4——农垦 58S-LD 幼穗 cDNA; 5, 6——农垦 58S-SD 幼穗 cDNA

图 5 水稻 *osRACD* 基因表达与育性转换性状相关的 RT-PCR 定量分析
1——λDNA *EcoR* I / *Hind* III 双酶切分子量标准, 2——农垦 58N-LD 幼穗 cDNA, 3——农垦 58S-LD 幼穗 cDNA, 4——农垦 58S-SD 幼穗 cDNA

RT-PCR 扩增条带的特性作了 Southern 杂交鉴定,证实该阳性扩增条带为 *osRACD* 基因的表达产物(图未示出). 这个结果进一步说明水稻 *osRACD* 基因的表达活性与光敏核不育水稻农垦 58S 的光周期育性转换性状之间,存在着明显的相关性.

3 讨论

利用 mRNA 差别显示技术分离目的基因,经常会产生假阳性差异条带^[14~16]. 其主要原因是由于凝胶电泳的分辨率低. 在 DDRT-PCR 产物凝胶电泳分离过程中,不同种类 cDNA 所产生的扩增条带在低分辨率凝胶电泳中,会以相同的速率泳动并堆积在同一位置上,产生出重叠、混杂的假阳性条带. 另一方面则是由于 PCR 反应的非特异性所致. 因为在 DDRT-PCR 反应过程中出现的一些差异条带,可能只是由 5'-末端随机引物单独扩增产生的,因而不存在 3'-末端锚定引物的互补序列. 显然这样的条带并不能真实地反映出基因表达的差异.

为了消除或减少假阳性的比例,本研究对 mRNA 差别显示体系作了若干方面的改良. 第一,采用薄层变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离系统,使凝胶板的长度增长到 88 cm,同时适当提高了凝胶中变性剂尿素的浓度. 这样便增强了凝胶变性的能力,减少了不同条带在电泳过程中出现堆积的情况,从而增加了不同条带间的距离,提高了差异条带的真实性和定位回收的准确性. 第二,考虑到 PCR 反应存在着非特异性现象,本研究除了做多次的重复实验之外,还以育性材料 58N 为对照进行比较分析,以进一步排除假阳性条带. 第三,为排除单引物扩增出现假阳性的可能性,对准确定位回收的差异条带,本研究在克隆双引物 2 次扩增产物的同时,还设计了只加入随机引物的单引物扩增阴性对照实验(图 6). 然后根据其结果,筛选出双引物扩增的具有 PolyA 结构的差别显示片段,进行克隆.

在 mRNA 差别显示实验中,辨别差异条带真实性的一个重要指标是,看其 3'-末端是否存在着 PolyA 尾巴. 我们从改良的 mRNA 差别显示实验中,随机检测了 27 条差异条带,结果是每一条 3'-末端均存在着 PolyA 尾巴. 而在本实验室早先使用的常规的 mRNA 差别显示实验中,具有 3'-末端 PolyA 尾巴的差异条带仅占总数的 25%左右. 由此可见,我们改良的 mRNA 差别显示体系,有效地降低了假阳性比例.

为了进一步验证 mRNA 差别显示实验中克隆的差异表达基因片段的真实性,通常要进行 Northern 杂交或 RT-PCR 定量分析. 但是对于那些 mRNA 表达丰度低的基因来说, Northern 杂交技术由于敏感性的限制,往往难以得到预期的结果. 而 RT-PCR 法具有灵敏、精确、快速等优点,可有效地避免因同源基因表达所造成的杂交信号的干扰,因此近几年来在动植物研究领域已得到了广泛的应用^[17, 18]. 我们根据文献^[17]设计了 RT-PCR 定量分析法,用来检测 *osRACD* 基因在 58S-LD 和 58S-SD 两组材料中差异表达的状况. 并根据水稻 *osRACD* 基因编码序列的 5'-末端和 3'-末端设计了一对引物,用来对水稻 *osRACD* mRNA 的反转录产物进

图 6 差异条带的随机引物单引物扩增阴性对照实验检测差异条带

两端的引物种类

1——差异条带回收后双引物扩增阳性鉴定, 2——差异条带回收后随机引物单引物扩增阴性对照, 3—— λ DNA *EcoR* I / *Hind* III 双酶切分子量标准

行特异性 PCR 扩增, 利用 ^{32}P 标记的 *osRACD* 基因作探针, 对扩增的条带作 Southern 杂交鉴定. 结果清晰地显示, *osRACD* 基因只在可育材料 58N-LD 和 58S-SD 中表达, 而在不育材料 58S-LD 中则不表达. 表明 *osRACD* 这个基因的表达活性与光周期调控的光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换之间确实存在密切的相关性.

研究表明, 光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换的分子机理是相当复杂的. 它涉及到光敏核不育基因与环境因子(光周期信号, 温度等)之间的相互作用, 以及由此引起的信号传导通路的变化, 最终导致幼穗发育模式的改变^[6]. 现已知道低分子量 GTP 结合蛋白是一种重要的信号传导分子, 在动植物体中参与多种信号传导通路的调节^[19~22]. 我们不仅分离到水稻低分子量 GTP 结合蛋白的编码基因 *osRACD*, 而且还应用 mRNA 差别显示分析和 RT-PCR 定量分析法, 检测到在光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换过程中 *osRACD* 基因表达活性存在着明显的差异. 因此深入地研究该基因的表达调控机理, 将有可能揭示光周期育性转换过程中光信号传导通路的分子网络系统. 本实验结果也告诉我们, 不能简单地从遗传角度考察光敏核不育现象, 还应从光温效应、信号传导以及特异性转录因子等诸多方面, 特别是育性基因的发育调控方面予以综合考虑.

致谢 本工作为国家“八六三”和国家基础研究发展规划资助项目.

参 考 文 献

- 1 石明松. 对光照长度敏感的隐性雄性不育水稻的发现和初步分析. 中国农业科学, 1985, (2): 44~48
- 2 袁隆平. 两系法杂交水稻研究进展. 中国农业科学, 1990, 23(1): 1~6
- 3 Zhang Q, Shen B Z, Dai X K, et al. Bulkied extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(18): 8675~8679
- 4 李子银, 林兴华, 谢岳峰, 等. 利用分子标记定位农垦 58S 的光敏核不育基因. 植物学报, 1999, 41(7): 731~735
- 5 梅明华, 陈 亮, 章志宏, 等. 农垦 58S 光敏不育基因突变位点的确定及 *pms3* 区间的进一步作图. 中国科学, 1999, C 辑, 29(3): 310~315
- 6 董 哲. 光敏核不育水稻的发育生物学研究评述. 植物学报, 1998, 40(3): 189~199
- 7 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992, 257: 967~975
- 8 陈春霞, 黄美娟, 柳 浩, 等. 不同发育状态下胡萝卜胚根基因的差异表达. 科学通报, 1996, 41(22): 2085~2087
- 9 张启发. 光敏核不育水稻的分子生物学研究. 见: 李泽炳, 主编. 光敏核不育水稻育性转换机理与应用研究. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995. 333~364
- 10 Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 11 周 立, 任东路. cDNA 文库的快速构建法. 生物工程进展, 1996, 16(1): 48~50
- 12 Xia G, Ramachandran S, Hong Y, et al. Identification of plant cytoskeletal, cell cycle related and polarity related proteins using *Schizosaccharmyces pombe*. Plant J, 1996, 10(4): 761~769
- 13 Borg S, Brandstrup B, Jensen T J, et al. Identification of new protein species among 33 different small GTP binding proteins encoded by cDNAs from lotus japonicus and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. Plant J, 1997, 11(2): 237~250
- 14 Liang P, Averboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 3269~3275
- 15 Liang P, Pardee A B. Recent advances in differential display. Curr Opin Immunol, 1995, 7: 274~280
- 16 Bauer D, Muller H, Reich J, et al. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). Nucleic Acids Res, 1993, 21: 4272~4280
- 17 Igor K, Vipula K S, Ji H A, et al. Activation tagging of the floral inducer FT. Science, 1999, 286: 1962~1965
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-19-2047>

- 18 Igor K, Vipula K S, Ji H A, et al. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, 1999, 286: 1962~1965
- 19 Yoshiyuki M, Jurg R, Elaine C S, et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science*, 1999, 286: 1954~1957
- 20 Li H, Lin Y K, Rachel M H, et al. Control of pollen tube tip growth by a rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *The Plant Cell*, 1999, 11: 1731~1742
- 21 Alan H. Rho GTPase and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998, 279: 509~514
- 22 Pontus A. Effectors for the Rho GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*, 1999, 11: 95~102
- 23 Claude N, William E B. GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 949~990

(2000-04-30 收稿, 2000-09-11 收修改稿)