- 5 Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. Current Protocols in Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1992
- 6 Dean A, Ley T J, Humphries R K, et al. Inducible transcription of five globin genes in K562 human leukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 5 515
- 7 Cuunningham J M, Stephen M J. Hemoglobin switching and fetal hemoglobin reactivation. Seminars in Hematology, 1996, 33 (1): 9
- 8 Matsuda M, Sakamoto N, Fukumaki Y. δ -Thalassemia caused by disruption of the site for an erythroid-specific transcription factor, GATA-1, in the δ -globin gene promoter. Blood, 1992, 80(5): 1 347
- 9 Moi P, Loudianos G, Lavinha J, et al. δ -Thalassemia due to a mutation in an erythroid-specific binding protein sequence 3' to the δ -globin gene. Blood, 1992, 79(2): 512
- 10 O' Neill D, Bornschlegel K, Flamm M, et al. A DNA-binding factor in adult hematopoietic cells interacts with a pyrimidine-rich domain upstream from the human δ -globin gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8 953

(1997-07-22 收稿, 1997-09-30 收修稿稿)

对一个在水稻雄蕊中大量表达的 cDNA 的结构和表达分析

张毅 瞿礼嘉* 刘美华 秦晓莉 顾红雅* 陈章良

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871. * 联系人)

摘要 雄蕊的发育是植物有性生殖过程中的一个重要阶段, 研究雄蕊发育过程中大量表达乃至特异表达的基因对于了解雄蕊发育的分子机制具有重要的意义. 在水稻雄蕊中大量表达的一个类查尔酮合酶基因(D5)的结构进行了分析, 发现 D5 与欧洲油菜中另外 2 个花药特异性基因(A1 和 BA42)的同源性较高, Northern 分析表明它们的表达模式相似, 而且可能与花粉的早期发育过程相关, 这说明 D5, A1 和 BA42 代表了一类与雄蕊发育相关的、特化的类查尔酮合酶基因.

关键词 花粉发育 减数分裂时期 水稻花药 cDNA 查尔酮合酶

在高等植物中, 花的发育是一个复杂的过程, 涉及到由营养分生组织(或花序分生组织)向花分生组织的转变, 花的形态建成以及雌、雄配子体的发育和分化. 研究表明, 花的不同发育阶段与特定基因的程序性表达相关^[1], 对这些基因的研究将有助于了解植物花的整个发育过程.

在对花器官发育的研究中, 对雄蕊发育的研究由于与雄性不育密切相关而尤为引人注目. 雄配子体发育进程可人为地分为 2 个阶段^[2], 即小孢子发生以及紧接着的雄配子体分化. 当小孢子有丝分裂产生了生殖细胞和营养细胞后, 即完成了发育过程, 其他类型的雄蕊细胞(如绒毡层), 给发育中的小孢子提供营养及结构物质, 对小孢子发育是非常重要的. 在小孢子发育过程中至少有两组基因在不同时间被激活^[3], 早期基因在有丝分裂后立即活化, 在成熟花粉中它们的 mRNA 水平下降或检测不到, 晚期基因在小孢子有丝分裂后变得很活跃, 其 mRNA 量不断积累, 直至花粉成熟, 推测早期基因很可能涉及到花粉发育, 而晚期基因涉及到花粉成熟或花粉管生长. 这些基因大多数功能依然不清, 但显然在雄蕊的发育中起着重要作用.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-6-607>

作者从水稻中克隆了一个在雄蕊中大量表达的新 cDNA (D5)^[4], 本文报道的是对 D5 的基因结构及表达方式的分析.

1 材料与方法

中花 8 号 (*Oryza sativa* var. japonica, Zhong-hua 8) 生长在温室中, 分别收集各不同发育时期的水稻小花以及成熟的雌蕊、雄蕊和花药并置于液氮中保存, 分别提取总 RNA. 1 周大小的幼苗经 UV 照射^[5] 5~6 h 后取其根、叶提取总 RNA, 未经诱导的幼苗根、叶用作对照.

从 SWISSPROT 数据库中取出所有目前已发现的在花组织中表达的 CHS 蛋白序列和几个代表性的 CHS 相关蛋白的序列, 将它们同 D5 蛋白以及 A1^[2], BA42^[6] 推导的蛋白序列放在一起, 经 GCG 中的 GCLUSTAL V^[7] 和 PRETTYBOX 软件处理作出序列对比.

将全长的 D5 cDNA 用随机引物标记法标记后用作探针, 用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取小花、雄蕊、叶、根以及经 UV 照射处理过的叶和根的总 RNA, 在 1.2% 的甲醛变性胶上进行分离, 转膜及杂交按 Zeta probe 膜 (Bio-Rad) 说明书推荐的程序进行.

根据 D5 cDNA 的核苷酸序列, 设计了一对引物, 扩增出 D5 的编码区.

5' 引物: 5' GCAT ATG GCT GAC CTT G 3', 3' 引物: 5' T CGA GTC TCA GTT
Nde I
AAT GC3'.

将 PCR 产物克隆到 pBluescript SK 上, 经测序验证后, 克隆到 pET16b 的 Nde I 和 BamH I 位点之间, 导入宿主菌 DE3 中进行诱导表达, 同时用诱导表达的矮牵牛 CHS-A 作为 Western 杂交的正对照. 收集诱导表达的菌体, 加入等体积的 2× 上样缓冲液后煮沸 5 min, 走 SDS-PAGE 及进行 Western blot, 转膜及杂交按照 Zeta probe (Bio-Rad) 所推荐的程序进行, 抗体为矮牵牛 CHS 抗体.

2 结果与讨论

2.1 D5 同 3 个雄蕊特异性表达基因有很强同源性

将 D5 核酸序列及蛋白序列送入数据库中比较后发现, D5 核酸序列同欧洲油菜 (*Brassica napus*) 中的 3 种雄蕊特异性转录本 (A1, C19 和 BA42) 有很高的同源性^[4]. 虽然这 3 个转录本都只是 cDNA 部分序列, 但原位杂交的结果表明, A1, C19 存在于小孢子发生阶段中的四分体以及小孢子释放阶段^[2], BA42 存在于绒毡层维管束外周细胞和小孢子中^[6]. D5 基因同这些雄蕊特异性基因的相似性为 79%~91.5% (图 1).

同时从图 1 中可以看出, D5, A1, BA42 在整体结构上与查尔酮合酶 (CHS) 及其相关蛋白 (CHS-related proteins) 的序列有一定的相似性 (36.9%~39.3% 相同), 但它们之间结构上的差异也是比较显著的^[4], 一些在 CHS 及其相关蛋白序列中保守的区域在 D5, A1 和 BA42 中发生了变化, 而 D5, A1 和 BA42 之间在这些相应的区域中序列却很保守 (图 1 中的 ·); 而且这种结构上的差异与基因的来源无关, 例如 D5 蛋白同水稻 CHS 蛋白有 37.7% 的同源^[8], 与其他植物的 CHS 蛋白的同源性也在 37% 左右. 这说明, 这几个在雄蕊中表达的基因相对比较独立, 具有与 CHS 及其相关蛋白不同的、独特的保守结构.

2.2 D5 的转录不受 UV 诱导

许多 CHS 及其相关蛋白的基因都具有可受紫外光诱导表达的特性. 为了弄清 D5 基因的

图1 D5推导氨基酸序列与A1, BA42和几种查尔酮合酶蛋白序列的比较

*代表几个花药特异性蛋白中保守的氨基酸残基, 黑框和灰框分别代表相同和相似的氨基酸, L代表短的亮氨酸
 拉链区, 箭头代表可能的催化位点 Cys 169

转录特性,我们用UV照射1周左右的水稻植株的叶和根,通过Northern杂交来观察D5表达是否受UV诱导.结果表明,D5基因的表达不受UV的诱导(图2).

2.3 D5的发育表达模式

另一个Northern杂交的结果表明,D5基因在减数分裂前期就已经开始转录,转录表达量较小;到减数分裂期转录水平有较大的增加,并在四分体时期达到最大,这一最大转录表达量持续到单核小孢子时期;当进入花粉成熟期时,D5基因的转录突然完全

停止,在这时以及后来的雌蕊、雄蕊中都检测不到该基因的表达(图3). D5基因的这一表达模式暗示它的表达与花药中花粉的早期发育过程密切相关,例如D5基因的表达模式与花药中绒毡层的发育模式非常相似. D5基因的精确表达位置还需要进一步通过原位杂交来观察.

2.4 D5蛋白没有CHS抗原决定簇

通过转载体,在原核系统中表达出D5蛋白,表达出的D5蛋白分子量约为44 kDa,与预测的大小一致.用矮牵牛CHS抗体为探针作Western杂交,结果表明,CHS抗体不能与表达的D5蛋白杂交(cross_hybridization)(图3).这说明D5蛋白不具有CHS抗原决定簇;D5蛋白与CHS及其相关蛋白不仅在一级结构上有不同之处,而且在抗原决定簇上也存在较大的差异.

2.5 D5, A1, BA42可能代表一类特化的类查尔酮合酶基因(CHS_like gene)

查尔酮合酶及其相关蛋白是植物中类黄酮生物合成途径中的催化酶.类黄酮类物质在许多重要的生理过程,如花色素的形成、胁迫保护、结瘤诱导和花粉的发育当中都起着关键的作用^[9].从被子植物到裸子植物,CHS蛋白的一级结构高度保守,不同植物的CHS氨基酸序列有80%~90%的相同性^[10];CHS与己烯雌酚合酶(stilbestrol synthase, STS)蛋白(一种CHS相关蛋白)之间有64%以上的相同性^[11].研究表明,类查尔酮合酶基因可能进化成一个超基因家族,各成员都有不同的调控方式以及不同但相关的酶促活性^[9],它们能够利用相同或类似的底物形成不同的产物(如STS)

图2 D5基因的转录与UV诱导的关系研究
A——幼嫩花药, B——花丝, C——叶, D——叶+UV, E——根, F——根+UV

图3 D5基因的转录表达模式
(a) Northern杂交; (b) RNA凝胶照片. A——减数分裂前期, B——减数分裂期, C——四分体时期, D——单核游离小孢子时期, E——成熟花粉时期, F——成熟雌蕊, G——成熟雄蕊, H——成熟花药

或催化 CHS 型(CHS-type) 的反应(如丫啉酮合酶 acridone synthase, ACS).

图4 D5 的原核表达产物 SDS-PAGE 及 Western 杂交(矮牵牛 CHSA 抗体为一抗)

M 为蛋白质分子量标记, A 为表达 CHSA 的大肠杆菌总蛋白, B 为表达 pTrcHisB 的大肠杆菌总蛋白, C 为表达 pET16b 的大肠杆菌总蛋白, D 为表达 pETD5 的大肠杆菌总蛋白; A', B', C', D' 为相应的 Western 杂交结果

D5 蛋白与 CHS 及其相关蛋白之间具有一定的同源性可能意味着 D5 蛋白具有催化 CHS 型反应的催化活性^[4]; 但它们之间的差异是明显的, D5 蛋白在反应中心和几个关键的保守区域都发生了变化; 它不仅没有识别 CHS 抗体的抗原决定簇, 而且它的编码基因也不能像 CHS 基因那样被 UV 诱导转录表达. D5 基因的表达仅限于雄蕊器官中, 而且从其表达模式看, D5 基因属于小孢子发育过程中的早期基因^[3], 它的表达可能与花药中花粉的早期发育密切相关. 推测 D5 基因代表的是查尔酮合酶超基因家族中的一类雄蕊特异性表达的新成员, 而具有类似表达模式的转录本 A1, C19 以及 BA42 则是 D5 基因在欧洲油菜中的同源基因(homologue). 目前 D5 反义基因已导入到水稻中并且正在对转基因水稻植株进行检测, 我们希望通过分析转基因植物中绒毡层细胞及花粉发育的情况, 为最终推测出 D5 基因的功能奠定基础.

致谢 本工作为国家高技术计划、国家自然科学基金(批准号: GN39670169)和国家教委留学回国人员科研启动基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Kamalay J C, Goldberg R B. Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell*, 1980, 19: 935~ 946
- 2 Scott R, Dagless E, Hodge R, et al. Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 195~ 207
- 3 Mascarenhas J P. Gene activity during pollen development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, 41: 317~ 338
- 4 Qu L J, Zhang Y, Xie M, et al. A chalcone synthase-like cDNA from rice anther. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10: 181~ 183
- 5 Koes R E, Spelt C E, Mol J N M. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential light-regulated expression during flower development and UV light induction. *Plant Mol Biol*, 1989, 12: 213~ 225
- 6 Shen J B, Hsu F C. Brassica anther-specific genes: characterization and *in situ* localization of expression. *Mol Gen Genet*, 1992, 234: 379~ 389
- 7 Higgins D G, Sharp P M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene*, <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-6-607>

- 1989, 73: 237~ 244
- 8 Reddy A R, Scheffler B, Madhuri G, et al. Chalcone synthase in rice (*Oryza sativa* L.): Detection of the CHS protein in seedlings and molecular mapping of the chs locus. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 735~ 743
- 9 Martin C R. Structure, function, and regulation of the chalcone synthase. *Intern Rev Cytol*, 1993, 147: 233~ 284
- 10 Fliegmann J, Schroeder G, Schanz S, et al. Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and different regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 489~ 503
- 11 Schroeder G, Brown J W S, Schroeder J. Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationships with chalcone synthase. *Eur J Biochem*, 1988, 172: 161~ 169

(1997-11-07 收稿, 1998-02-04 收修改稿)

玉米品种纯度和电泳酶谱纯度的比较研究

杨太兴 郭乐群 张 忠 谷明光

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 用垂直平板不连续系统聚丙烯酰胺凝胶同工酶电泳方法对套袋自交的 5 个玉米自交系及其 7 个参交种(组合)和 7 个掺入父母本自交系种子的处理进行了酶谱纯度检验. 检验结果, 将种子不纯部分分为混、杂和变 3 大原因. 发现田检品种纯度高于室内酶谱纯度, 且有直线正相关关系. 当含变异株时, 回归相关系数 r 为 0.898 2; 如用播前已知混杂率和电泳实测混杂率(不含变异株率)进行回归时, r 为 0.999 9. 实测混杂率略高于已知混杂率 0.33%, 但实测变异株率平均高达 3.5%. 同时证明, 杂交组合出苗率为 85.71%, 当混入二分之一父母本自交系后的出苗率平均只有 77%. 因此, 室内酶谱纯度低于田检品种纯度应是顺理成章.

关键词 玉米 同工酶电泳 品种纯度 酶谱纯度

品种纯度的高低关系到一个品种的优良种性体现的程度, 是种子分级定价的主要依据, 是稳产高产的重要保证. 玉米种子纯度检验, 当前国内外仍然采用田间种植检验(田检)作为法定标准^[1]. 为此, 每年生产的种子必须到南方去冬季田检或者在制种当地第二年田检合格后才能用于生产. 由于田检费用高、时间长, 一些种子生产和销售部门或个人不做田检, 直接销售, 导致一些不合格种子给生产造成不应有的重大损失. 为了保证品种纯度, 找到一个快速、准确和低成本的室内检验的法定方法至关重要.

目前国内外室内检验玉米种子纯度的方法仍然是电泳检验方法, 而且认为室内检验结果优于田检结果^[2~5]. 我们曾以市场上销售的种子作材料检验品种纯度时, 发现玉米田检品种纯度高于室内电泳酶谱纯度^[6]. 为了让室内电泳检验结果更符合田检结果, 促进电泳检验的法定标准制定, 开展了以下试验.

1 材料与方法

用套袋自交和杂交的方法, 获得 5 个自交系和 7 个杂交组合作为材料. 将这些种子分为杂种与杂种加父母本两部分(见表 1), 同时将这两部分再各分成两部分. 其中一部分作田检, 另一部分作室内电泳酶谱纯度检验. 田检方法和室内电泳检验方法参见以前方法^[6, 7].