

水稻野败型细胞质雄性不育系统花药的 RRM 特异引物差异展示分析

景润春 易平 孙清萍 朱英国*

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 生命科学学院遗传研究所, 湖北武汉 430072)

提 要 根据 RRM RNA 结合蛋白基因家族共有保守序列设计特异引物, 对水稻野败型细胞质雄性不育系、保持系、恢复系及 F₁ 杂种单核期花药进行差异展示分析。不同材料间具有稳定表达的组成型 RRM RNA 结合蛋白基因, 同时具有丰富的差异表达的具调控功能的 RRM RNA 结合蛋白基因。不同材料间差异表达的 RRM RNA 结合蛋白基因类型分析说明 RRM RNA 结合蛋白基因家族参与了细胞质雄性不育系统的核质互作。F₁ 杂种中特异表达差异片段可能与育性恢复或杂种优势有关。

关键词 水稻; 细胞质雄性不育; RNA 识别基序; RNA 结合蛋白基因家族; 差异展示

Analysis of the Patterns of Displayed cDNA of Uninucleate Stage Anthers of WA-CMS System Using RRM Specific Primer

JING Run-Chun YI Ping SUN Qing-Ping ZHU Ying-Guo

(The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology and Institute of Genetics, College of Life Science, Wuhan University, Hubei 430072)

Abstract Differential display of mRNAs was used to analyze the difference of gene expression in uninucleate stage anthers of WA-CMS system, including a sterile line, its maintainer line, restorer line, F₁ hybrid, with RRM specific primer to study the molecular basis of interaction between the nucleus and the cytoplasm. The primer was designed based on consensus sequence from RRM RNA-binding protein gene family. The results showed that there were stable expressed fragments among the different mRNA samples. The different expressed fragments were divided into several different types based on their relationship with the mRNA samples, which were thought to play an important role in regulating gene expression. The results indicated that the RRM RNA-binding protein gene family participated in the pathway of interaction between the nucleus and the cytoplasm. The specific expressed fragment in uninucleate stage anther from the F₁ hybrid was probably related to fertility restoration or heterosis.

Key words *Oryza sativa* L.; Cytoplasmic male sterility; RNA recognition motif; RNA-binding protein gene family; Differential display

* 本文得到国家自然科学基金资助(39770455)
作者简介: 景润春(1970-), 男, 河北献县人, 博士。

* 朱英国, 通讯联系人
收稿日期: 2000-4-10, 接收日期: 2000-9-21

Received on: 2000-4-10, Accepted on: 2000-9-21

生物个体在生长发育过程中, 基因的表达在转录、转录后和翻译 3 个水平上都受到严格的调控。20 世纪 70 年代基因割裂现象发现至今已有众多转录因子和剪接因子被鉴定和克隆。转录调控是基因表达调控的第一步, 而转录后的调控决定着基因表达最终产物的类型和丰度^[1]。转录后调控过程涉及众多蛋白质, 其中最重要的是一类含 RNA 识别基序(RNA recognition motif, RRM)的 RNA 结合蛋白。RRM 通常由 80~ 90 个氨基酸组成, 其中含有 8 个氨基酸和 6 个氨基酸组成的 RNP1 和 RNP2 两个结合 RNA 所必需的高度保守的亚基序, RNP1 和 RNP2 分别位于 RRM 二级结构 β_1 - α - β_2 - β - $\alpha\beta$ - β_4 中 β 和 β_1 反向平行的片层结构中央位置。目前, 在人、动物、植物、真菌、细菌等不同物种中已发现约 300 个含 RRM 的 RNA 结合蛋白基因, 但研究主要集中于人、动物和微生物上, 在植物中尚知之甚少^[2]。

水稻杂种优势的利用已在我国粮食生产中取得了巨大成就, 其中野败型(wild abortive, WA)杂交水稻产量约占我国杂交水稻总产量的 90%^[3]。同时, 水稻由于具有较小基因组, 已建成高密度分子标记连锁图和较稳定成熟的转化系统, 已成为禾本科植物分子生物学的模式植物^[4]。因此, 我们选用水稻野败型细胞质雄性不育系、保持系、恢复系和不育系与恢复系杂交所得 F₁ 代杂种单核期花药为材料, 根据 RNP1 高度保守区域设计特异引物, 结合锚定引物进行差异展示比较分析, 以揭示含 RRM 的 RNA 结合蛋白基因家族在水稻野败型细胞质雄性不育系统特定发育时期的作用。

1 材料与方 法

1.1 水稻单核期花药总 RNA 提取

选用水稻野败型细胞质雄性不育系珍汕 97A、保持系珍汕 97B、恢复系 IR24 和(珍汕 97A × IR24)F₁ 代植株为材料。在幼穗发育的适宜时期取花药压片以鉴定花粉发育时期, 并结合植株外部形态特征判定单核期幼穗, 于 4℃ 冷库中剥取中选幼穗中部的花药。总 RNA 提取采用 Promega 公司 Total RNA Isolation System 并遵其说明进行操作。获取的总 RNA 经含 2.2 mol/L 甲醛的变性琼脂糖凝胶检测合格后贮于 -70℃ 冰箱备用。

1.2 Poly(A)mRNA 的分离和反转录

Poly(A)mRNA 的分离采用 Pharmacia Biotech 公司 mRNA Purification Kit 并遵照其说明书进行操作。反转录参照 Sambrook^[5]方法, 锚定引物为购自 Gibco 公司 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer。

1.3 PCR 扩增及产物分离

PCR 扩增采用与反转录相同的锚定引物, 上游特异引物根据 Birney^[2]和 Lazar^[6]文献设计为 5'-GGA TGCTGAA GA TGCT-3', 由上海 Sangon 公司合成。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中 Taq DNA 聚合酶 1.0U, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 10 × 扩增缓冲液 2.5 μ L, 200 μ mol/L dNTPs, 1 μ L DM SO, 1 μ L 反转录产物, 0.2 μ mol/L 引物。PCR 程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 4℃ 保存。PCR 反应于 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 扩增仪上进行。PCR 产物于 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离后, 经 Promega Silver Sequence DNA Sequencing System 银染显带并照像记录实验结果。

1.4 差异带回收再扩增及 Northern 杂交分析

根据银染显示的带型直接用无菌刀片挖出差异条带, 放入 100 μ L 无菌双蒸水中水浴煮沸 10 min, 后 10000 r/min 离心 2 min, 取上清 4 μ L 为底物, 用上述同样反应条件进行回收

条带DNA再扩增,并把扩增产物与原PCR产物同时5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测再扩增效果。Northern杂交分析参照 Sambrook^[5]进行,用变性PCR Marker指示分子量大小。

2 结果与分析

2.1 水稻野败型细胞质雄性不育系统单核期花药的RRM特异引物差异展示分析

水稻野败型细胞质雄性不育系统的RRM特异引物差异展示图谱(图1)显示:RRM特异引物结合3锚定引物在珍汕97A、珍汕97B、IR24及F₁杂种单核期花药mRNA样品中均具有多条扩增产物带型,表明在水稻中同样存在着具RRM基序的RNA结合蛋白基因家族。

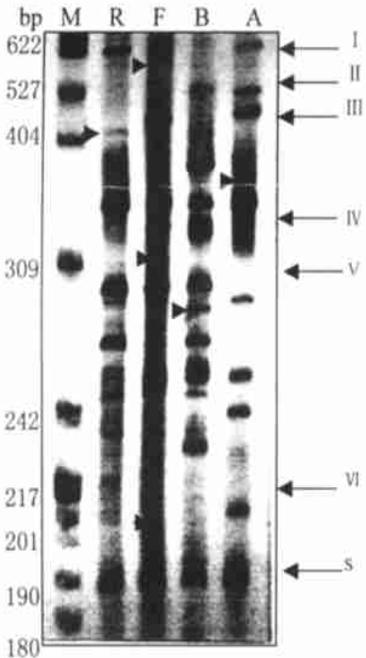


图1 水稻野败型细胞质雄性不育系统单核期花药的RRM特异引物差异展示图谱 A为珍汕97A、B为珍汕97B、F为F₁杂种 R为IR24、M为分子量Marker pBR322/Msp I, S长箭头所指为材料间组成型稳定表达带型, I、II、III、IV、V、VI长箭头所指为材料间交叉类型的带型, 照片中短箭头所指为材料特异表达类型的带型。

Fig. 1 Patterns of displayed cDNA from uninucleate stage anther of the WA-CMS system of rice using RRM specific primer, A stands for Zhenshan 97A, B stands for Zhenshan 97B, F stands for F₁ hybrid, R stands for IR24, M stands for DNA molecular weight marker

从差异展示图谱可见,在水稻野败型细胞质雄性不育系统单核期花药中具有组成型稳定表达的RRM RNA结合蛋白基因,这类基因在不育系、保持系、恢复系和F₁杂种间表达无差异,(图1中S长箭头所指);还有一些见调控功能的RRM RNA结合蛋白基因在不育系、保持系、恢复系和F₁杂种间只丰富差异片段可根据不同材料间的不同差异带型划分为几种类型(图1中I、II、III、IV、V、VI长箭头所指和照片中短箭头所指)。根据差异类型不同可以把具调控功能的RRM RNA结合蛋白基因的差异表达归纳为表1。从表1可见,在珍汕97A、珍汕97B、F₁杂种、IR24等4个材料中均存在材料特异表达类型的RRM RNA结合蛋白基因(图1的照片中短箭头所指),由于珍汕97A与珍汕97B是同核异质体关系,所以RRM RNA结合蛋白基因家族的转录明显受到细胞质的调控。另外,由于野败型细胞质雄性不育系统内细胞核和细胞质在材料间的差异及核质互作的影响,差异表达的RRM RNA结合蛋白基因中存在着多种材料间交叉类型(图1中I、II、III、IV、V、VI长箭头所指),表明RRM RNA结合蛋白基因家族广泛参与了野败型细胞质雄性不育系统中核质互作关系的形成。

2.2 F₁杂种中特异表达的RRM RNA结合蛋白基因cDNA片段的Northern杂交分析

我们选取于F₁杂种中特异表达的分子量约320bp的差异片段(图1照片中短箭头所指)FB,并从银染聚丙烯酰胺凝胶中回收再扩增。差异片段FB,回收再扩增产物的琼脂糖凝胶检测结果(图2)说明FB从银染聚丙烯酰胺凝胶中回收再扩增的效果良好,分子量大小与

聚丙烯酰胺凝胶电泳结果相符合,回收再扩增产物可以作为Northern杂交的探针。

F₁杂种中特异表达的差异片段FB的Northern杂交分析结果(图3)显示,FB在珍汕97A、珍汕97B、IR24、F₁杂种中均具分子量约1.2kb的转录本,而在F₁杂种中多一条分子

量略小的转录本(图 3 中箭头指示); 另外在 IR 24 中 1.2 kb 转录本的丰度相对较低, 可见 RRM RNA 结合蛋白基因家族的基因表达调控不仅表现在转录本类型, 也表现在转录本丰度上。F₁ 杂种中特异表达的差异片段 FB 的真实性得到 Northern 杂交的验证, 这也说明本文中采用的高退火温度的 RT-PCR 反应的可靠性较高。

3 讨论

本文用 RRM 特异引物对水稻野败型细胞质雄性不育系统内不育、保持系、恢复系和杂种 F₁ 单核期花药的 mRNA 进行差异展示分析, 这是 RRM RNA 结合蛋白基因家族在细胞质雄性不育系统中作用方式研究的首次报道。已有研究结果表明, 虽然 RRM 基序具有许多保守性很强的氨基酸以保证其与 RNA 的结合活性, 但不同 RRM RNA 结合蛋白却可特异地结合不同的 RNA 分子, 从而在细胞代谢过程中发挥重要作用^[1, 7]。本实验发现水稻野败型细胞质雄性不育系统内不同材料间存在着组成型表达的 RRM RNA 结合蛋白基因, 这类基因可能对细胞基本代谢活动的进行, 起着重要的作用。另外不同材料间 RRM RNA 结合蛋白基因也存在着丰富的差异表达, 说明 RRM RNA 结合蛋白基因家族的

表 1 具调控功能的 RRM RNA 结合蛋白基因在水稻野败型细胞质雄性不育系统的差异表达

Table 1 Polymorphism of displayed cDNA among different mRNAs sample from WA-CMS system

差异表达类型 Types of different expressed fragment	珍汕 97A Zhenshan97A	珍汕 97B Zhenshan97B	F ₁ F ₁ hybrid	IR 24 IR 24
I	+	-	-	+
II	+	+	-	-
III	+	-	+	-
IV	-	+	+	-
V	-	+	+	+
VI	-	-	+	+
VII	⊖	-	-	-
VIII	-	⊕	-	-
IX	-	-	⊖	-
X	-	-	-	⊕

注: “+”表示为扩增片段存在; “-”表示为片段缺失; “⊖”表示为材料特异表达片段。

Notes: “+”stands for differential expressed fragments; “-”stands for deletion of differential expressed fragments“⊖”stands for specific expressed fragments of the mRNA s sample in WA-CMS system

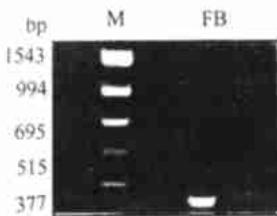


图 2 F₁ 杂种特异表达差异片段从银染聚丙烯酰胺凝胶中回收再扩增, FB 为回收再扩增片段
Fig 2 Reamplification of the specific expressed fragment in F₁ hybrid from silver stained polyacrylamide gel

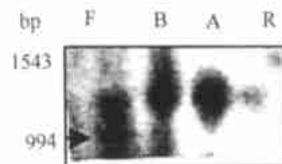


图 3 F₁ 杂种中特异表达的差异片段 FB 的 Northern 杂交分析 R 为 IR 24, A 为珍汕 97A, B 为珍汕 97B, F 为 F₁ 杂种, 箭头所指为 F₁ 杂种中特异表达的转录本

Fig 3 Northern blot analysis of a specific expressed cDNA fragment in mRNA s from F₁ hybrid R stands for IR 24, A stands for Zhenshan 97A, B stands for Zhenshan 97B, F stands for F₁ hybrid

转录明显受到细胞质的调控,这可能与 RRM RNA 结合蛋白基因家族广泛参与转录后的调控有关,也可说明转录后调控类型的丰富程度。

单核期对水稻野败型细胞质雄性不育系统是十分关键的发育时期,直接影响着育性恢复程度及产量构成因子的形成。本实验发现 RRM RNA 结合蛋白基因家族参与了细胞核与细胞质的相互作用。同时,细胞质雄性不育性的形成与育性恢复均与细胞质内线粒体基因组变异与转录后调控有关。本变验中 F_1 杂种中特异表达或缺失的差异片段可能与育性恢复或杂种优势有一定关系。

随机引物差异展示技术揭示的多是 mRNA 3 端少部分 mRNA 片段信息^[8, 9, 10],而根据基因家族中共有保守序列设计特异引物进行高退火温度的差异展示分析可能更有利于遗传信息的揭示。

参 考 文 献

- 1 Burd CG, G Drefuss, *Science*, 1994, 265(5172): 615~ 621
- 2 Birney E, S Kumar, A R Krainer *Nucleic Acid Research*, 1993, 21(25): 5803~ 5816
- 3 Yuan L P. *Proc Asian-Pacific Conf. Agric Biotechnol*, Beijing: China Science and Technology Press, 1992, 97~ 105
- 4 Ko Shimamoto. *Science*, 1995, 270: 1772~ 1773
- 5 Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989, 432~ 450
- 6 Lazar G, T Schaal, T Maniatis et al *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7672~ 7676
- 7 Kenan D J, C C Query, J D Keene *TIBS*, 1991, 16(6): 214~ 220
- 8 Liang P, A B Pardee *Science*, 1992, 257: 967~ 970
- 9 张弛, 陈受宜 *中国科学*, 1995, 25(8): 840~ 847
- 10 程宁辉, 高燕萍, 杨金水等 *植物学报*, 1997, 39(4): 379~ 382