

水稻 CAS 基因的克隆及分析

赵昕, 高雅, 胡英考, 何奕昆* (首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

摘要 [目的]克隆并分析水稻 *OsCAS* 基因, 研究其在水稻生长中的作用。[方法]以粳稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) 品种日本晴为材料进行总 RNA 提取并进行 RT-PCR 扩增, 随后鉴定 *OsCAS* 在水稻不同组织中的表达。[结果] *OsCAS* 基因包含 1164 个碱基对, 编码 387 个氨基酸。实时定量 PCR 结果显示, *OsCAS* 在水稻不同组织中的表达水平存在差异, 叶片中表达量最高, 茎中略低, 根中的表达量最低。[结论] 该研究可为水稻 *OsCAS* 基因在抗逆反应中的作用研究提供试验基础。

关键词 Ca^{2+} ; 胞外钙离子受体 (CAS); 进化

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)28-13488-02

Cloning and Analyzing of Rice CAS Gene

ZHAO Xin et al (College of Life and Science, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract [Objective] This research aimed to clone and analyze rice *OsCAS* gene, and to study the function of it in the growth of rice. [Method] Taken nipponbare, the variety of *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* as material to extract the total RNA and to carry out RT-PCR amplification. Then the expression of *OsCAS* in different tissues of rice was identified. [Result] *OsCAS* gene contains 1164 base pairs and codes 387 amino acids. The results of Real-Time PCR indicates the expression level of *OsCAS* in different tissues of rice differs. In leaf, the expression is highest, lower in stem, and lowest in root. [Conclusion] This research could provide experimental references for the effects study of rice *OsCAS* gene in the stress reaction.

Key words Calcium; Extracellular- Ca^{2+} -sensing receptor (*OsCaS*); Evolution

近来植物中胞外 Ca^{2+} 受体的分子鉴定取得了突破性进展。在拟南芥保卫细胞中, 胞外 Ca^{2+} 受体提高胞外 Ca^{2+} 浓度, 引起胞内 Ca^{2+} 信号。利用表达克隆的方法, 分离到一个含有 387 个氨基酸的质膜蛋白——CAS (Calcium Sensing Receptor)^[1]。最新的研究结果表明, $[Ca^{2+}]_i$ 振荡与 $[Ca^{2+}]_o$ 振荡—CAS—IP₃ 途径偶联。拟南芥中, $[Ca^{2+}]_i$ 振荡与 $[Ca^{2+}]_o$ 振荡同步, 这种同步作用主要是通过胞内钙感受受体 CAS 介导的。CAS 调控 IP₃ 的浓度, 从而直接从细胞内钙库释放 Ca^{2+} ^[2]。通过序列搜索比对, 笔者发现在其他植物中有与其相似性很高的序列, 推测它们具有相似的功能。

1 材料与方法

1.1 材料 所用水稻材料为粳稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) 品种日本晴 (Nipponbare)。

1.2 植物总 RNA 的提取 (Trizol 法) 培养水稻的幼苗, 取其幼嫩的叶片, 采用 Trizol 法提取植物的 RNA, 具体方法见参考文献 [3]。

1.3 RT-PCR 扩增水稻 *OsCAS* 基因 设计引物进行 PCR 扩增。引物 5' TTTATGGCGCCCTTCGGTGTG 3' 与 5' TTTCAGCCGTCACGCTGCC 3' 由上海生工合成。反转录反应体系 10 μ l (MgCl₂ 2 μ l; 10 \times RNA PCR buffer 1 μ l; Rnase Free H₂O 3.25 μ l; dNTP Mixture 1 μ l; RNase inhibitor 0.25 μ l; AVM Reverse Transcriptase 0.5 μ l; 特异下游引物 1 μ l; 样品 RNA 1 μ l)。反应的条件: 45 $^{\circ}$ C, 25 min; 99 $^{\circ}$ C, 5 min; 5 $^{\circ}$ C, 5 min。

PCR 反应体系 50 μ l (2 \times PCR GC buffer 25 μ l; dNTP 8 μ l; Primer1 1 μ l; Primer2 1 μ l; ddH₂O 6.5 μ l; Template 8 μ l; LATaqE 0.5 μ l)。反应条件: 预变性, 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性, 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火, 61 ~ 65 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸, 72 $^{\circ}$ C, 2 min。30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 反应产物进行琼脂

糖凝胶电泳, 回收目的基因片段, 再与 T-vector 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经鉴定为阳性的菌落, 送上海生工测序。



图1 水稻总 RNA 电泳示意

Fig.1 Total RNA gel electrophoresis schematic diagram of rice

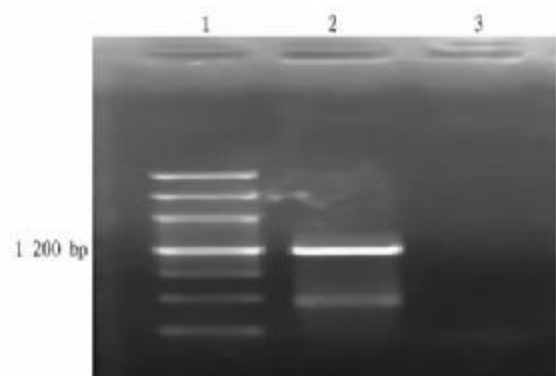


图2 水稻 RNA RT-PCR 结果

Fig.2 RT-PCR result of Rice RNA

1.4 Real-Time PCR 鉴定 *OsCAS* 在水稻中不同组织中的表达 利用 Trizol 法提取总 RNA 并纯化, 以除去 RNA 中 DNA, 再将总 RNA 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 反应。

PCR 反应体系的组成: 2 \times SYBR Green qPCR mix 25 μ l; Primer (2 pmol forward, 2 pmol reverse) 2 μ l; cDNA template 2 μ l; H₂O, 补齐 50 μ l。

作者简介 赵昕 (1975 -), 女, 黑龙江哈尔滨人, 讲师, 从事植物分子生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2009-06-02

PCR 反应程序:步骤 1,50 °C 2min;步骤 2,95 °C 10 min;步骤 3,95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环;步骤 4,95 °C 15 s,60 °C 15 s,95 °C 15 s。

2 结果与分析

2.1 水稻 OsCAS 基因的克隆 通过在 GeneBank 中进行比对,发现在水稻基因组中有一段序列与拟南芥 CAS 具有很高的相似性,采用同源克隆的策略,在水稻中克隆了 OsCAS 基因(序列号AY476807)。

采用 Trizol 法提取植物总 RNA,取 1μl 进行琼脂糖凝胶电泳,检查所提取 RNA 的纯度及完整性。由图 1 可见,电泳图可明显地分辨出 5 S、18 S、28 S 3 条带,说明所提取的 RNA 是比较完整的,可以进行后续试验。

用所提取的 RNA 进行 RT-PCR,结果如图 2 所示,图中 1 号点样孔为 Marker,2 号点样孔为特异下游引物扩增的结果,3 号为阴性对照。由图 2 可见,RT-PCR 扩增出了 1 条 1 200 bp 左右的条带。

2.2 水稻 OsCAS 的序列分析 水稻 CAS 序列分析表明,OsCAS 包含 1 164 个碱基对,编码 387 个氨基酸。尽管拟南芥和水稻分属于单子叶植物和双子叶植物,但 CAS 氨基酸序列有高达 70% 的相似性(图 3)。它们都有 5 个内含子,而且内含子的插入位点都是一致的(图 4)。在水稻和拟南芥 CAS 序列的羧基端,都有一个硫氰酸酶 - 结构域,推测与植物的抗逆性有关。

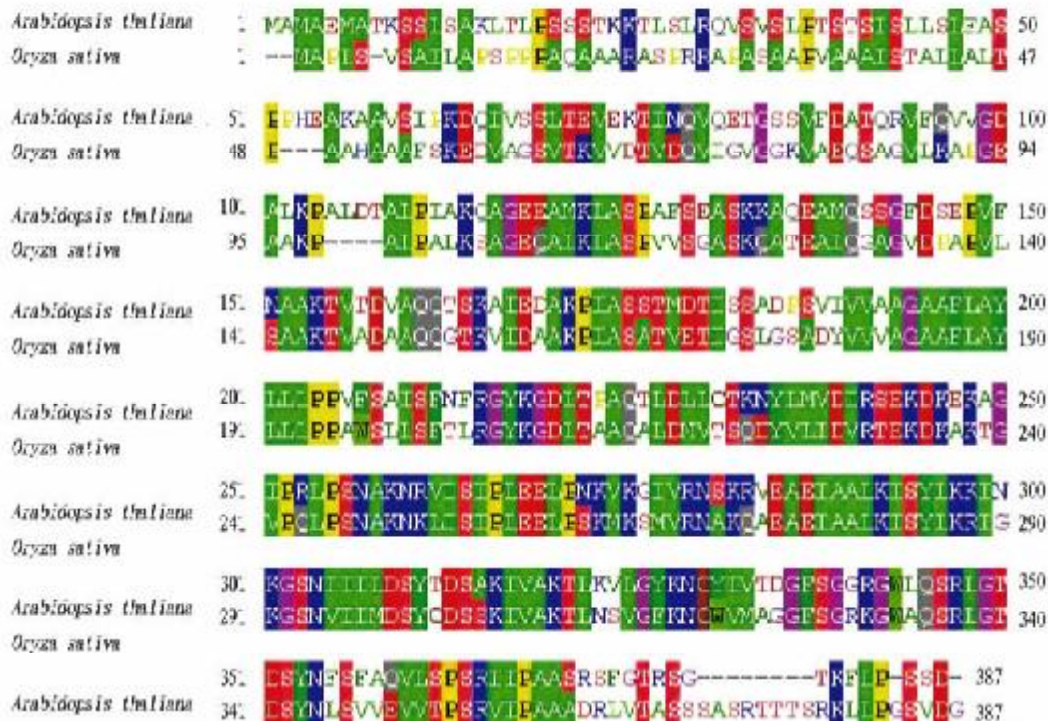


图 3 拟南芥和水稻 CAS 序列比对

Fig.3 Sequence alignment of CASs in *Oryza sativa* and *Arabidopsis*

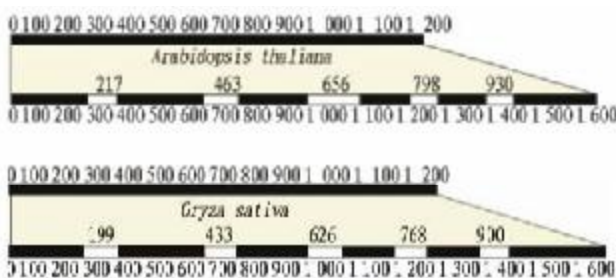


图 4 拟南芥和水稻 CAS 内含子插入位点比较

Fig.4 Comparison of intron insert sites of CAS gene between *Oryza sativa* and *Arabidopsis*

2.3 OsCAS 在水稻不同组织中的表达 Real-Time PCR 结果显示,OsCAS 在水稻不同组织中的表达水平是有差异的。在叶中表达量最高为 32.14,茎中次之为 4.08,根中表达量最低,仅为 0.62。

3 结论与讨论

在植物中,大部分 Ca²⁺ 存在于细胞壁和质膜外表面,对于稳定细胞壁和细胞膜的结构至关重要^[4-5],此外还参与了

许多生理过程^[6]。植物细胞的胞外钙离子受体蛋白是 2003 年从拟南芥保卫细胞中克隆到的,命名为 CAS。这个蛋白定位在质膜上,能够结合钙离子,感受胞外钙离子的变化,从而引起胞内钙离子信号。这些受体蛋白的克隆,使人们确信 Ca²⁺ 在细胞中可以发挥第一信使的功能。

将拟南芥的 CAS 基因的序列在水稻基因组中进行比对,发现在水稻中存在与 CAS 基因相似的序列。采用同源克隆的方法,克隆了水稻中的 OsCAS 基因。拟南芥与水稻的 CAS 基因 cDNA 序列及氨基酸序列具有很高的相似性,尤其是在 C 端。C 端为胞内序列,位于膜内侧,主要功能是介导蛋白质与蛋白质之间的相互作用。拟南芥与水稻的 CAS 基因在 C 端都具有与硫氰酸酶 - 结构域序列相似的保守区,此结构域序列在磷酸脂酶、植物衰老有关蛋白、细菌中的 PsPE 及 G1Pe、氰化物、砷酸盐等抗逆蛋白中都有其保守序列,推测它可能在一些抗逆反应中具有一定的作用。CAS 的 N 端为胞外序列,无保守序列,且水稻与拟南芥 N 端序列同源性比较差,可

(下转第 13497 页)