

两个水稻 MADS 盒基因 cDNA 的克隆与分析*

袁自强 钱晓茵 刘军 刘建东 钱旻 杨金水**

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘要 为研究水稻 MADS 盒基因与形态发生的关系, 采用一个 MADS 盒基因家族保守区域特异的引物, 运用 RT-PCR 方法, 从水稻珍汕 97B 的幼穗中分离和克隆了两个新的 MADS 盒 cDNA, 命名为 nmads1 和 nmads3. 基因序列分析表明, nmads1 和 nmads3 都含有植物 MADS 盒基因典型的 MIK 区结构, 其中 nmads1 属于 MADS 盒基因的 GLO 亚家族, nmads3 属于 AGL2 亚家族. 分子杂交实验发现, nmads1 和 nmads3 在水稻愈伤组织分化期和幼穗期活跃表达, 在营养生长阶段的苗期表达受抑制, 并发现处在同一发育阶段的水稻幼穗中, 核质互作雄性不育系珍汕 97A 比其保持系珍汕 97B 多出了一个特异表达的 nmads1 的基因产物.

关键词 MADS 盒基因 水稻 cDNA 克隆 形态发生

MADS 盒基因(由最早发现的 4 个 MADS 盒基因的第一个大写字母合并而来)广泛存在于动植物、人类和酵母中, 参与有关细胞分化的基因调控. 它们编码的产物在靠近 N 端处都含有一段约 60 个氨基酸组成的高度同源的保守序列, 功能涉及与 DNA 结合, 称之为 MADS 盒^[1]. 已发现的 MADS 盒基因绝大多数属于庞大的植物 MADS 盒基因家族, 与植物花的形态发生密切相关, 其中某些成员的突变会产生形态异常的花朵^[2]. 孟征等人^[3]在水稻中发现了一个与花的形成有关的 MADS 盒 DNA. 近来研究发现, 在无花器官的低等植物蕨类中, 也有 MADS 盒基因的表达^[4]. 此外, 在豆科植物根部皮层细胞经根瘤菌感染, 诱导细胞去分化的过程中, 也发现涉及 MADS 盒基因的特异表达^[5], 这些均说明植物 MADS 盒基因的功能不仅仅涉及花的发育. 本实验以水稻为材料, 针对 MADS 盒保守区设计引物, 利用 RT-PCR 方法, 从幼穗中分离了两个新的 MADS 盒 cDNA, 并对其在水稻不同分化发育阶段和水稻愈伤组织形态发生中的差异表达进行了研究, 以期更深入地探讨植物 MADS 盒基因的功能.

1 材料与方 法

(1) 水稻材料. 籼型水稻 (*Oryza sativa* L. spp. Indica) 珍汕 97B (保持系) 和珍汕 97A (不育系), 种子由中国水稻研究所提供, 稻株种植于复旦大学试验田.

(2) 培养基. 愈伤组织培养基为 N6 基本培养基附加 2 mg/L 2,4-D 和 0.3 mg/L 6-BA; 分化培养基是 N6 基本培养基附加 0.3 mg/L 2,4-D 和 2 mg/L 6-BA.

1999-03-31 收稿, 1999-06-04 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号:39770047)资助项目

** 联系人

(3) 水稻幼穗的取材和镜检. 田间种植的水稻珍汕 97B 和珍汕 97A 植株进入幼穗分化时,剥出幼穗,置于显微镜下观察,确定其发育时期. 剥取的幼穗大多处于颖花原基分化期(幼穗长约 2 mm)和雌雄蕊原基形成期(幼穗长约 0.5~1 cm).

(4) 水稻脱分化及再分化愈伤组织的培养. 珍汕 97B 的种子剥壳,消毒后接种到愈伤组织培养基,一周左右即可长出米黄色的脱分化愈伤组织. 经继代培养,挑选生长良好的愈伤组织接种到分化培养基,2~3 周即可长成带绿点及小芽的再分化愈伤组织.

(5) 水稻幼苗材料的培养. 珍汕 97B 的种子,经 10%次氯酸钠溶液消毒后,播于沙盘中,长至 10 d 后采集幼苗,经表面清洗,液氮速冻,-70℃保存备用.

(6) 总 RNA 提取及浓度测定. 不同水稻样品各取 2 g,用热酚法^[6]提取总 RNA,紫外分光光度计测量 RNA 的浓度.

(7) RT-PCR 方法分离水稻 MADS 盒 cDNA. 水稻 mRNA 的反转录,PCR 扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳,目的 cDNA 片段的回收,再扩增和纯化等均参照文献^[7]进行. 其中用于 PCR 扩增的 5'端引物 C(5'-GATCAAGAGCATCGAGAA-3'),是针对 MADS 盒基因家族中靠近 N 端处最保守的一段氨基酸序列 IKSIEN,按 Fisher 等人^[8]的报道合成. 3'端 poly A 引物有两个,一个是单锚定的附加限制酶 *Hind*Ⅲ 接头的引物 Y1 (5'-AAGCTTTTTTTTTTTT-3'),一个是未锚定的附加限制酶 *Bam*H I 接头的引物 BT17 (5'-GGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). PCR 反应程序为: 94℃, 5 min; 54℃, 2 min; 72℃, 2 min, 然后是 40 个循环 95℃, 30 s; 54℃, 100 s; 72℃, 120 s. 最后 72℃延长 7 min. 目的 cDNA 片段与 pGEM \ IT 载体(Promega)连接,转化 XLI-blue 菌株.

(8) DNA 序列分析. 由上海皓嘉生物技术公司采用自动测序法测序. GCG 软件处理 DNA 序列,搜索 GenBank 中同源序列,进行同源性比较.

(9) Southern 杂交分析. Southern 电泳,转膜,杂交,洗膜均按 Sambrook 等人^[9]的方法进行,采用 68℃严谨条件杂交.

2 结果与分析

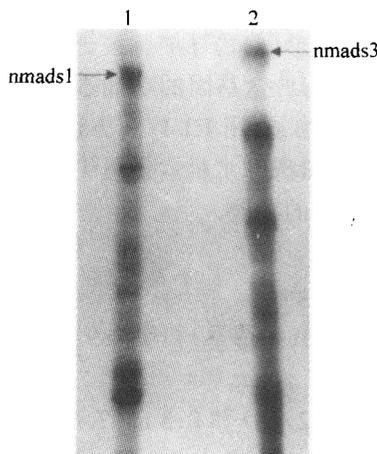


图 1 RT-PCR 产物的电泳图谱
1,2 分别代表 C+Y1 和 C+BT17 引物组合的扩增产物

2.1 RT-PCR 方法分离水稻幼穗中含 MADS 盒保守区的 cDNA 片段

利用两个引物组合 C+Y1 和 C+BT17,用 RT-PCR 方法从珍汕 97B 的幼穗中分离了若干 cDNA 片段(图 1). 回收了 18 条分子量较大,信号较强的 cDNA 片段,分别与珍汕 97B 的幼穗总 RNA 进行 Northern 杂交,选择杂交信号较强的两个 cDNA 片段进行克隆,测序. 测序结果表明,这两个 cDNA(分别为 760 bp 和 949 bp)都含有保守的 MADS 盒区,分别命名为 nmads1 和 nmads3.

2.2 DNA 序列

nmads1 有 760 个核苷酸,终止密码子在第 473 个核苷酸处,共编码 157 个氨基酸(图 2). nmads3 有 949 个核苷酸,终止密码子在第 710 个核苷酸处,共编码 236 个氨基酸(图 3). nmads1 和 nmads3 的 5'端都是从设计的 MADS 盒保守区引物

```

GATCAAGAGCATCGAGAACTCCACCAACCGCCAGGTGACCTTCTCCAAGCGCAGGAGCGG      60
  I K S I E N S T N R Q V T F S K R R S G
GATCCTCAAGAAGGCCCGCGAGATCAGCGTCTGTGCGACGCCGAGGTCCGGCGTCGTCAT      120
  I L K K A R E I S V L C D A E V G V V I
CTTCTCCAGCGCTGGCAAGCTCTACGACTACTGCTCCCCAAGACCTCGCTATCAAGAAT      180
  F S S A G K L Y D Y C S P K T S L S R I
CTTGGAGAAGTACCAGACCAATCCGAAAGATACTGTGGGATGAGAAGCACAAGAGCCT      240
  L E K Y Q T N S G K I L W D E K H K S L
TAGCGCGGAGATTGATCGAATCAAGAAAGAGAACGATAATATGCAGATTGAGCTCAGGCA      300
  S A E I D R I K K E N D N M Q I E L R H
CTTGAAAGGTGAAGATCTAAACTCTCTGCAGCCAAAGAGCTCATCATGATTGAGGAGGC      360
  L K G E D L N S L Q P K E L I M I E E A
ACTTGACAATGGGATAGTGAACGTGAATGATAAACTGATGGACCACTGGGAAAGGATAAG      420
  L D N G I V N V N D K L M D H W E R I R
ATGCTGGAAGACGAGAAACAAGCTGCTGGCTTTCAAACCTGCACCAGCAAGATATAGCGCTG      480
  C W K T R T S C W L S N C T S K I *
AGCGGGAGCATGAGGGATCTTGAGCTTGGGTACCATCCAGACAGGGACTTTGCGGCCCGAG      540
ATGCAGATCACCTTCCGCGTGCAGCCAGCCACCCCAACCTGCAGGAGAACAATTAAGCT      600
GCTAGGTTGCCCGCCACTTCGATCAGTTATCTCATCCACTGATCCACCACTGGATTGAA      660
TGTCCTAGTGCACTTGTCAACTGTATCCCTGTTTCATGTCTGTTTCGATGAACTATTGAG      720
CATGTCATATGTGAGTTGCTTTGTGTGCCAAAAAAAAAAAAA      760

```

图2 nmads1 cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

下划双线表示 MADS 盒区,下划单线表示 K 区图右侧的数字表示核苷酸的序列

开始,3'端到 polyA 终止。根据 MADS 盒基因家族同源性比较,绝大多数 MADS 盒 cDNA 的起译密码位于该保守引物上游的第 7 个氨基酸处(图 4),因此, nmads1 和 nmads3 都是接近全长的 cDNA。根据核苷酸和氨基酸的序列同源性比较,从 GenBank 中搜寻到与 nmads1 和 nmads3 同源性最高的前 100 多个基因都属于 MADS 盒基因家族。经分析 nmads1 和 nmads3 含有植物 MADS 盒基因的典型结构,即 N 端的 MADS 盒区,间隔的 I 区,亚保守的 K 区和 C 末端区^[10],因此可以确定 nmads1 和 nmads3 是植物 MADS 盒基因家族成员(nmads1 和 nmads3 在 GenBank 中的登录号分别为 AF095645, AF095646)。

nmads3 与其核苷酸同源性最高的小麦 TaMADS12 相比,其核苷酸顺序在 11~162, 303~506, 608~642 三个区段的一致性分别达 94%, 80%, 91%。与 nmads3 编码的氨基酸同源性最高的 4 个基因分别是 OSMADS6(水稻), TaMADS12(小麦), ZAG5 和 ZAG3(玉米)。它们在 1~219 氨基酸区段的一致性分别达 73%, 70%, 68% 和 68%。

nmads1 和与它同源性最高的水稻 OSMADS2 基因^[11]相比较,5'端的 415 个核苷酸前编码的氨基酸同源性高达 99%, 在其后的一段核苷酸同源性也达 98%, 但在第 416 个核苷酸处, nmads1 比 OSMADS2 少了一段 13 bp 的序列并造成了移码,其后两者编码的氨基酸序列完全不同。重复测序证明该差异区段并非测序差错所造成,而是真实存在。我们认为, nmads1 和

GATCAAGAGCATCGAGAACAAGATAACCCGGCAGGTCACCTTCTCCAAGCGCCGCAACGG	60
<u>I K S I E N K I T R Q V T F S K R R N G</u>	
CCTCCTCAAGAAGGCGTACGAGCTCTCCGTGCTCTGCGACGCGGAGGTGGCGCTCATCAT	120
<u>L L K K A Y E L S V L C D A E V A L I I</u>	
CTTCTCCAGCCGCGGAAGCTGTACGAATTCGGTAGCGCCGGAATAAACAAGACATTGGA	180
<u>F S S R G K L Y E F G S A G I N K T L E</u>	
AAAGTACAATAGTTGCTGTTACAACGCTCAAGGTTCAAATAGTGCTCTTGCTGGTGGTGA	140
K Y N S C C Y N A Q G S N S A L A G G E	
ACATCAGAGCTGGTACCAAGAGATGTCAAGGCTCAAGACTAAGCTTGAATGTCTCCAACG	300
<u>H Q S W Y Q E M S R L K T K L E C L Q R</u>	
CTCTCAGAGGCACATGCTTGGTGAAGATCTTGACCATTGAGCATAAAGGAACTGCAGCA	360
<u>S Q R H M L G E D L G P L S I K E L Q Q</u>	
GCTGGAGAAGCAACTTGAGTACTCACTGTCACAGGCTCGACAACGAAAGACACAAATCAT	420
<u>L E K Q L E Y S L S Q A R Q R K T Q I M</u>	
GATGGAGCAGGTCGACGATCTTCGCCGGAAGGAACGCCAGCTTGGAGAGCTCAATAAGCA	480
<u>M E Q V D D L R R K E R Q L G E L N K Q</u>	
ACTGAAAAACAAGCTAGAAGCTGAAGCCGATAGCAGCAACTGCAGATCAGCCATCCAGGA	540
L K N K L E A E A D S S N C R S A I Q D	
TTCCTGGGTCCATGGCACCGTCGTCAGTGGCGCAGAGTGCTGAATGCTCAACCACCACC	600
S W V H G T V V S G G R V L N A Q P P P	
AGATATTGACTGTGAGCCTACTCTGCAAATGGGTACTATCAATTTGTCCGCTCTGAGCG	660
D I D C E P T L Q I G Y Y Q F V R P E R	
GCCAATCCAAGAAGCAATGGAGGAGGAGGGGATCAGAACAACAACCTTTGTGATGGGATGG	720
P I Q E A M E E E G I R T T T L *	
CCCCTCTGAAGTCCAAGCTTGCTAATAAAAACGCTGGCGTGTATAATATATAGTTCGGC	780
AAATGTTGAATCACATGTGTTCTCAGTATGTATTTCTCCCTATCCGGTTGTACTCTT	840
AGCACGTACCTATGAGTGATGTTTGTACGTTATCTATACTCTATGCTAGGCAACCCTAT	900
ACTATTATGGTAAGACGTCTATCTTTTCAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA	949

图 3 nmads 3 cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

说明同图 2

OSMADS2 很可能是由于进化过程中基因复制事件造成的两个不同基因,也可能是同一个基因由内含子可变剪切造成的不同基因产物. 这种现象在其他植物的 MADS 盒基因研究中有过报道^[12]. 确定 nmads1 和 OSMADS2 的关系还有待更多的实验证据.

通过 nmads1, nmads3 和 MADS 盒基因家族的氨基酸同源性比较得知, nmads1 属于 GLO 亚家族, nmads3 属于 AGL2 亚家族. 同一亚家族成员在 MADS 盒保守区的同源性很高,其氨基酸的变化和相应位置都有相似性(图 4). nmads1 与 GLO 基因的 MADS 盒区氨基酸一致性达 70%, nmads3 与 AGL2 亚家族中的 AGL6, ZAG3, ZAG5 同源性较高,其 MADS 盒区的氨基酸一致

结合 PCR 产物电泳图谱及分子杂交结果可以看出,一些 RT-PCR 扩增出的明显条带,没有杂交出任何信号,而一些相对较弱的条带却杂交出了明显的信号,如 *nmads1* 与图 5(b) 的杂交情况. 这既反映了 RT-PCR 反应容易出现的假阳性现象,也说明了进行分子杂交的必要性. 这从一个侧面反映了杂交结果的真实性,表明杂交结果没有受到底物背景干扰.

2.4 *nmads1* 和 *nmads3* 在珍汕 97A 与珍汕 97B 幼穗中的差异表达

饶有兴趣的是,*nmads1* 和 *nmads3* 与野败珍汕 97A 和珍汕 97B 幼穗来源的 RT-PCR 扩增产物的杂交带型显示明显的差异(图 5). 在与 *nmads1* 的杂交中,珍汕 97A 含有 0.75 和 1.2 kb 两条杂交带,而珍汕 97B 仅含 0.75 kb 一条杂交带,并且前者的表达水平远高于后者. 在与 *nmads3* 的杂交中,珍汕 97A 的表达水平也明显高于珍汕 97B. 据报道^[13],在小麦核质互作雄性不育产生的花器官异常中,检测到类似 MADS 盒基因 *GLO* 和 *DEF* 亚家族成员的突变表型. 为何在珍汕 97A 中 *nmads1* 的表达多出一个 1.2 kb 的基因产物,其 0.75 kb 产物数量大于保持系珍汕 97B, *nmads3* 的表达也强于珍汕 97B,是否同雄性不育的表型有关,是一个值得深入研究的问题.

由于 MADS 盒基因的 MADS 盒框在同一亚家族的不同成员中具有很高的保守性,在分子杂交所显示的杂交带中尚不能排除含有其他 MADS 盒基因的可能性. 尽管如此,因不同组织来源的 RNA 与 *nmads1* 和 *nmads3* 探针杂交的条带位置及信号显示明显差异,说明水稻不同发育阶段及不育系和保持系幼穗组织发生涉及 MADS 盒基因的差别表达. 此外,本研究中分子杂交的温度控制在 68℃ 的严谨条件下,采用的探针大部分区段属于同源性较低的非 MADS 盒区,如果杂交带中含有其他 MADS 盒基因的话,也应属于同一亚家族的不同成员.

参 考 文 献

- Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, et al. Genetic control of lower development by homotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 1990, 250: 931 ~ 936
- Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, et al. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factor. *Nature*, 1990, 346: 35 ~ 39
- 孟 征, 刘国振, 许智宏, 等. 水稻基因组 MADS 盒 DNA 的克隆与分析. *中国科学, C 辑*, 1998, 28(5): 450 ~ 456
- Hasebe M, Wen C K, Kato M, et al. Characterization of MADS homeotic genes in the fern *Ceratopteris richardii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6222 ~ 6227
- Heard J, Dunn K. Symbiotic induction of a MADS ~ box gene during development of alfalfa root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5273 ~ 5277
- Sacco D, Hoge H, Bisseling T, et al. Isolation of total and polysome RNA from plant tissue. In: Gelvin S B, Schilperoort R A, Verma D P, eds. *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. 1 ~ 13
- 程宁辉, 杨金水, 高燕萍, 等. 玉米杂种一代亲本基因表达差异的初步研究. *科学通报*, 1996, 41(5): 451 ~ 454
- Fasher A, Saedler H, Theissen G. Restriction fragment length polymorphism-coupled domain-directed differential display: A highly efficient technique for expression analysis of multigene families. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5331 ~ 5335
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9.31 ~ 9.58
- Purugganan M D, Rounsley S D, Schmidt R J, et al. Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics*, 1995, 140: 345 ~ 356
- Chung Y Y, Kim S R, Kang H G, et al. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA*. *Plant Science*, 1995, 109: 45 ~ 56
- Kyozuka J, Haraurt R, Peacock W J, et al. Eucalyptus has functional equivalents of the Arabidopsis *API* gene. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 573 ~ 584
- Ogijara Y, Futami K, Tsuji K, et al. Alloplasmic wheat with *Aegilops crassa* cytoplasm which express photo-period-sensitive homeotic transformation of anthers, show alterations in mitochondrial DNA structure and transcription. *Mol Gen Genet*, 1997, 255: 45 ~ 53