

水稻小 G 蛋白 *OsPra2* 基因的克隆及功能分析

赵志强^{1,3}, 傅亚萍², 杨鹏^{1,3}, 张玉满¹, 颜永胜^{1,3}, 方荣祥¹, 孙宗修², 陈晓英¹

1 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

3 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 利用 micro array 技术对水稻幼苗在营养胁迫条件下根部基因表达的研究中发现: 一个与豌豆 *Pra2*(小 G 蛋白) 基因有同源性的基因的 RNA 水平在营养胁迫后再补充营养时, 表达量下降。用 RT-PCR 和 PCR 方法分别获得该基因的 cDNA 克隆—*OsPra2* 和该基因翻译起始位点上游 1 kb 的启动子序列。*OsPra2* 基因编码的蛋白质具有结合 GTP/GDP 的 4 个保守结构域和构成小 G 蛋白 Rab 家族的特有的结构域。该基因 cDNA 与 GST 蛋白基因融合表达载体在洋葱表皮细胞中的瞬间表达结果显示该蛋白定位在在细胞膜和细胞核上, *OsPra2* 基因启动子与 *GUS* 报告基因融合表达转基因水稻显示该基因启动子驱动 *GUS* 在胚芽鞘和根中表达, 35S 启动子驱动 *OsPra2* 基因过表达转基因水稻与野生水稻株型相比明显矮化, 类似 BR 缺陷型植物株型。本实验还对 *OsPra2* 和 P450 蛋白的相互作用及在 BR 代谢途径中的可能作用进行了分析。

关键词: 水稻, 小 G 蛋白, 矮化

Cloning and Function Analysis of the Rice Small GTP-binding Protein Gene *OsPra2*

Zhiqiang Zhao^{1,3}, Yaping Fu², Kun Yang^{1,3}, Yuman Zhang¹, Yongsheng Yan^{1,3}, Rongxiang Fang¹, Zongxiu Sun², and Xiaoying Chen¹

1 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 State Key Laboratory of Rice Biology, National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Gene expression in rice roots under nutritional stress was studied using micro array techniques. The results showed that when re-supplied with sufficient amounts of nutrition after nutrition stress, the expression of *OsPra2* (a small G protein which is homologous with Pea *Pra2* protein) decreased in the plants root tissue. The cDNA sequence of the *OsPra2* gene and its promoter, which is about 1 kb upstream of the translation origin point, was obtained using RT-PCR and PCR approaches. The *OsPra2* protein contains four conserved GTP/GDP binding domains and specific domain of Rab small G protein family. The expression of *OsPra2* and GST fusion protein in onion epidermal cells showed that *OsPra2* protein was localized in the membrane and nucleus of the cell. The fusion expression of *OsPra2* promoter and *GUS* reporter gene in transgenic rice suggested that the *OsPra2* promoter allowed *GUS* expression in coleoptiles and roots. Compared with wild type rice, *OsPra2* over expressed transgenic rice showed an obvious

Received: July 21, 2008; **Accepted:** September 18, 2008

Supported by: Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KSCXZ-YW-N-025).

Corresponding author: Zongxiu Sun. Tel: +86-571-63370377; E-mail: sunzx405@tom.com

Xiaoying Chen. Tel: +86-10-64861838; E-mail: chenxy@sun.im.ac.cn

中国科学院知识创新项目(No. KSCXZ-YW-N-025)资助。

dwarf phenotype which resembles the BR deficient rice.

Keywords: rice, small G protein, dwarf

小 GTP-结合蛋白(Small GTP-binding proteins)是一类能够结合 GDP/GTP 的单亚基蛋白质,存在于包括酵母到人的所有真核生物中,形成一个超过 100 个成员的蛋白超级家族。这一超级家族按照结构分为 Ras、Rho、Rab、Sar/Arf 和 Ran 五个家族^[1]。小 G 蛋白分子量大约在 20~30 kD 之间,为了与异三聚体 G 蛋白相区别称之为小 G 蛋白。小 G 蛋白广泛参与调控诸多细胞功能,如细胞分化、激动蛋白重组、膜转运以及蛋白和 RNA 的运输^[2]。Rab 家族的不同成员定位于细胞内与胞吞和胞吐相关的膜上,在真核细胞的膜泡运输中起到重要的调控作用^[3]。目前已经从高等植物中分离克隆出许多 Rab 亚家族的基因^[4-7]。豌豆 Pra2 属于小 G 蛋白 Rab 亚家族成员,其表达受到光的负调控。Pra2 在暗环境下诱导表达,通过调节一个 BR 的合成途径中 P450 蛋白酶的活性促进豌豆下胚轴中 BR 的合成,进而使豌豆下胚轴细胞拉伸,胚轴伸长^[8]。

本实验室利用 micro array 技术对水稻幼苗在营养胁迫条件下根部基因表达的研究中发现:一个与豌豆 Pra2 同源的小 G 蛋白基因的 RNA 水平在氮、磷、钾 3 种营养胁迫 48 h 后再补充营养时,表达量下降,为了对该基因的功能进行研究,利用 RT-PCR 方法获得了该基因(*OsPra2*)的全长 cDNA 序列并利用 PCR 方法克隆了 *OsPra2* 基因翻译起始位点上游 1 kb 的启动子 DNA 片段,进一步构建了 *OsPra2* 基因 cDNA 和 GFP 基因融合表达载体,35S 启动子驱动的 *OsPra2* 基因的植物表达载体和 *OsPra2* 基因的启动子与 *GUS* 报告基因相融合的植物表达载体。利用基因枪将 *OsPra2* 基因和 GFP 基因融合表达载体转化洋葱表皮细胞中,通过观察 GFP 荧光蛋白了解 *OsPra2* 的亚细胞定位。通过农杆菌介导的转化方法获得了 35S 启动子驱动 *OsPra2* 基因过量表达的转基因水稻和 *OsPra2* 基因的启动子驱动 *GUS* 报告基因表达的转基因水稻,并对 T0 代和部分 T1 代转基因水稻进行了初步的生理生化和分子生物学的研究。结果显示: *OsPra2* 蛋白位于细胞的核和细胞膜中。过量表达 *OsPra2* 基因的转基因水稻较野生型日本晴明显矮小,外观类似于 BR 突变体。*OsPra2* 基因

启动子可以驱动 *GUS* 报告基因在水稻胚芽鞘和根中表达。本实验还对 Pra2 蛋白和 P450 蛋白的相互作用及其在 BR 代谢途径中的作用进行了分析。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare)为基本研究材料和转基因的受体。用于提取 RNA 或其他检测的水稻幼苗在温室中用 1/2 × Hoagland 培养基进行水培种植,在 25°C 条件下培养至三叶期,取幼苗的叶和根,在液氮中速冻后放置在 -80°C 的冰箱中保存。转基因水稻的培养和扩繁按普通水稻种植方式进行。

1.2 水稻总 RNA 的提取

水稻总 RNA 的提取采用 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂,并按 Invitrogen 公司提供的方法进行。

1.3 植物表达载体的构建及转化

1.3.1 *pBI221OsPra2::GFP* 载体的构建

构建由 35S 启动子驱动的 *OsPra2* 蛋白基因 (GenBank Accession No. NC_008399.1)与 GFP 荧光蛋白基因的融合表达载体: *pBI221OsPra2::GFP*,合成 Pra2 蛋白基因上下游引物,并在引物两端引入合适的内切酶位点和保护碱基:引物 1(5'-3'): TTAA TCTAGATGGAGGAGGAGGATTATGTG;引物 2(5'-3'): TTAACCCGGGAGAGCATGAGAACCCTGCTCA。从水稻全长 cDNA 中扩增 *OsPra2* 序列。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切 GFP 表达载体 *pBI221GFP* (*pBI221GFP* 由本实验室构建和保存)和 *OsPra2* 的 PCR 产物,连接二者得到 *OsPra2::GFP* 融合表达载体 *pBI221OsPra2::GFP*。利用基因枪将该载体转化到洋葱表皮细胞中,再使用共聚焦显微镜观察融合蛋白的细胞定位。观察完后,用 30% 的蔗糖溶液浸泡洋葱表皮 20 min 使洋葱表皮细胞发生质壁分离,再用共聚焦显微镜观察融合蛋白是否定位在在细胞壁中。

1.3.2 *OsPra2* 基因启动子的克隆和表达载体的构建

在 KOME 上预测的最长的 ORF,在起始密码子上游取 1 kb 的启动子序列,根据其序列合成上下游引物并引入合适的酶切位点和保护碱基,上游引物

位于 *OsPra2* 基因翻译起始位点上游 1 kb 处, 下游引物位于 *Pra2* 蛋白翻译起始位点: 引物 3(5'-3'): AAAAAGCTTGTACGCGAGTGCAAGTTCATGAA 引物 4(5'-3'): AAAAGGATCCGATATCTATCAA TGGACTAATCACTA 以水稻全基因组 DNA 为模板, 利用上下游引物通过 PCR 方法扩增 *OsPra2* 启动子序列。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 产物, 胶回收后连接 pGEM-载体(Promega)中, 测序正确后, 酶切并接入 pCambia1300-pBI221 载体(本实验室构建和保存)以替换其中的 35S 启动子, 得到 *OsPra2* 启动子与 *GUS* 报告基因相融合的植物表达载体 pCambia1300*OsPra2::GUS*。将该表达载体质粒通过电击转化进入农杆菌 EH105 感受态细胞中, 再通过农杆菌介导的方法转化水稻愈伤组织, 在潮霉素筛选压力下再生分化获得 *OsPra2* 启动子驱动报告基因表达的转基因水稻。

1.3.3 *OsPra2* 过量表达载体的构建

合成引物并引入合适的内切酶位点和保护碱基, 上游引物位于 *OsPra2* 基因翻译起始位点, 下游引物位于 *OsPra2* 基因翻译终止位点:

引物 5(5'-3'): AAAAGGATCCATGGAGGAGGAGGAGGATTATGTGTTTC; 引物 6(5'-3'): AAAAGAGCTCTTAAGAGCATGAGCACCTGCTCAC 以水稻全长 cDNA 为模板, PCR 扩增 *OsPra2* 基因的蛋白编码序列, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 PCR 产物胶回收后接入 pGEM-T 载体测序正确后转接到 pCambia1300-MCS(本实验室构建和保存)载体上, 得到 35S 启动子驱动的 *OsPra2* 基因植物表达载体 pCambia1300::*OsPra2*, 用电击将该载体转化进入农杆菌 EH105 感受态细胞中, 再通过农杆菌介导的方法转化水稻愈伤组织, 在潮霉素筛选压力下再

生分化获得 35S 启动子驱动 *OsPra2* 基因表达的转基因水稻。有这一载体构建得到的转基因水稻植株命名为: 35S::*OsPra2cDNA*(O)(括号中为相应的简称, O 表示过量表达)。

1.4 RT-PCR 方法检测水稻基因表达水平

1.4.1 RT-PCR 方法检测 *OsPra2* 基因表达水平

在 15 μ L 的体系中含 2 μ g 水稻全 RNA, 0.5 μ g poly T(18)引物, 70°C 5 min 变性处理后迅速置冰上冷却, 然后加入 1.25 μ L 10 mmol/L dNTP 混合物, 0.625 μ L(25 u)的 RNA 酶抑制剂, 5 mol/L M-MLV RT 反转录酶反应缓冲液, 1 μ L(200 u)的反转录酶 M-MLV RT (Promega), 补充无离子水使反应总体积达到 25 μ L, 37°C 反应 60 min, 70°C 10 min 终止反应, 得到水稻的全 cDNA 序列, 用该 cDNA 序列做模板, 分别用 *OsPra2* 的特异引物, 引物 5 和引物 6(见 1.3.3)和作为内参的水稻 β -*actin* 基因的 cDNA 的特异引物: 引物 7(5'-3'): GAACTGGTATGGTCAAGGCTG; 引物 8(5'-3'): ACACGGAGCTCGTTGTAGAAGPCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min 后, 按 94°C 30 s, 60°C 40 s, 72°C 1 min 的程序反应, 进行 28 个循环, 最后在 72°C 延伸 10 min, 所获得的产物在 1%琼脂糖凝胶上做电泳分离, 用 Bio-Rad GEL-Doc 1000 凝胶成像分析仪观察条带的亮度, 确定反转录样品的之间 PCR 扩增量的比例。

1.4.2 半定量 RT-PCR 方法检测 BR 合成途径相关基因表达水平

根据水稻中 BR 合成途径中 6 个酶(Markers: *Oswarf*、*Oscpd*、*D2R*、*OsBRI1*、*D11*、*OsBRL1*)的序列序列合成引物如表 1 所示, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 对这 6 个 Marker 的表达量进行半定量 RT-PCR 测定。PCR 条件参照方法 1.4.1 进行。

表 1 研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')
<i>Oswarf</i> -F	ATGGTGT TGGTGGCGATTGGGGTGGTTG
<i>Oswarf</i> -R	ATGTTGTTCCGCCCCAGGATGTCCAGCA
<i>Oscpd</i> -F	TTCTTCTCCATCCCCTTTCTCTC GCCA
<i>Oscpd</i> -R	CACCCCTCCGCCTCAAGA AGCTCCTCAA
<i>D2</i> -F	TTCAACCCATG GAGGTGGAA
<i>D2</i> -R	GCACGGTGGGGA AGTTGACGA
<i>OsBRI</i> -F	TATCGCTAT GGGACTGTTATTCTCAC
<i>OsBRI</i> -R	GCAAC ACATCCTCCAAGCTG
<i>D11</i> -F	TTGGG TCATGGCATGGCAAGAGCAAGGA
<i>D11</i> -R	TTGTTGCTGGAGCCAGCATTCTCTCT
<i>OsBRL1</i> -F	GGTGTCCGTGAGCCGCTA AG
<i>OsBRL1</i> -R	TGCAGTGAATTCCCGGTCAC CTTGG

1.5 GUS 组织染色法

取 pCambia1300*OsPra2::GUS* 载体转基因水稻 T1 代苗期植株进行 GUS 组织化学染色, 染液各成分比例如下: 0.1 mmol/L PBS(1 mol/L Na₂HPO₄, 1 mol/L NaH₂PO₄), 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 1 mmol/L K₃Fe(CN)₆, 20% 甲醇, 0.1% Triton-100, 0.5 mg/mL X-Glu。染色环境条件为 37°C 4 h, 乙醇脱色。观察结果, 用 Nikon5900 照相机拍摄。

1.6 GFP 融合蛋白的亚细胞定位

用基因枪 (Biolistic PDS-1000/He) 转化 pBI221*OsPra2::GFP* 到洋葱表皮细胞中, 26°C 培养 24 h 后用共聚焦显微镜 (LSM510; Zeiss) 观察细胞中 *OsPra2* 与 GFP 融合蛋白的荧光镜像。同样的材料用 10% 的蔗糖处理使细胞质壁分离, 再观察目的蛋白在细胞膜上的定位。GFP 的绿色荧光是由一个 488 nm 激光束激发和一个 500~530 nm 的滤波器散射完成的。

1.7 酵母双杂交

由于在豌豆中 *Pra2* 是通过和下游效应因子 DDWF1(P450)相互作用促进 BR 的生物合成的, 因此本实验室克隆了水稻中 DDWF1 的直系同源基因 P450(GenBank Accession No. NC_008402.1)。利用 PROQUEST™ Two-Hybrid System 检测 *OsPra2* 和 P450 蛋白的相互作用。将 *OsPra2* 基因克隆到 pDBLeu 表达载体上, P450 基因克隆到 pPC86 表达载体上。将 pDBLeu-*OsPra2* 和 pPC86-P450 两个载体分别和共转化进入 Mav203 酵母感受态细胞。然后通过不同的选择培养基培养观察两者是否相互作用。

2 结果与分析

2.1 水稻 *OsPra2* 蛋白质的结构域分析

OsPra2 基因编码一个含 225 个氨基酸的蛋白质, 该蛋白质具有结合 GTP/GDP 所必需的 4 个保守结构域: I, 结合磷酸基的结构域 GDSAVGK; II, 强化鸟嘌呤结合的蛋白序列 NKAD; III, 协调 GTP 的 β 和 γ -磷酸基的序列 DTAGQE; IV, 协助鸟嘌呤结合和解离的序列 ETS A。另外, *OsPra2* 蛋白也具有 Rab 家族共有的结构域 YYRGA(图 1)。

通过 NCBI Specialized BLAST 对水稻 *OsPra2* 蛋白氨基酸序列进行比对, 结果显示 *OsPra2* 蛋白含

有小 G 蛋白 Rab 亚家族的 Rab11-like 保守序列。将与 *OsPra2* 蛋白相似性较高的 6 个水稻小 G 蛋白 (GenBank 登录号分别是: ABG73466、NP_001063731、EAZ44047、CAA41966 和 NP_001064476) 用 VNTI 生物分析软件做蛋白序列比对, 结果显示: 水稻 *OsPra2* 蛋白是一个典型的小 G 蛋白(图 2), 其含有的保守性序列与小蛋白的 GTPase 功能以及附着细胞膜的机制密切相关^[1]。

```

1 ATGGAGGAGGAGGATTATGTGTCAAGGTGGTGGTATCGGGACTCGGCGTGGGGAAG
1 M E E E D Y V F K V V V I G D S A V G K
61 ACGCAGCTGCTGGGGCGTTACAAAGGACGAGTTCTTCATCGACTCAAATCGACCATC
21 T Q L L G R F T K D E F F I D S K S T I
121 GGCATCGAGTTCAGACGCGGCGTGGAGATCGGCGGGAAGCGGGTGAAGCCGACATC
41 G I E F Q T R T V E I G G K R V K A Q I
181 TGGACACCGCGGGGAGGAGGATCCGCGCGCTACCAGCGCTACTACCAGCGCGCC
61 W D T A G Q E R Y R A V T S A Y Y R G A
241 CTCGGCGCCATGCTCGTCTACGACGTCACCAGCGCGGAGCTTCACCACCGCGCCCGC
81 L G A M L V Y D V T S R R S F H H A A R
301 TGGCTCCACGACCTCCGCGCCACGCGGACACTCCATCGTCTGCTCATCGTCCGCAAC
101 W L H D L R A H A D N S I V V M L I G N
361 AAGCGGACCTCTCCACGCGCGCGCTCGCGCGCAGGAGCGCGCGCTTCGCGGAG
121 K A D L S H A R A V A A D E A A A F A E
421 GACCAGGGCTCTTCTTCCGAGGCGTCCGCGCTCAGCGGGGACACGCTCAGGAGGGCC
141 D Q G L F F S E A S A L S G D N V E E A
481 TTCCTCGGCTCTCCGGAGATCCATGCCATCGTCTCGGGAGGTCGCTGCTGGAGATG
161 F L G L L R E I H A I V S R R S L L E M
541 GACGGCATCAACGGCGAGCGCGCCCAACGCGCGCTCATGCTCAGGGGACCC
181 D G I N G D A A A N A N A A L M L R G T
601 AAGCTCTCGCTCTCCGACGAGCTCTCCATCATGGAGACGACGCTCAAGAGAGTGAGC
201 K L S L S D E L S I M E T S A I K R V S
661 AGGTGCTCATGCTCTTAA
221 R C S C S *

```

图 1 *OsPra2* 的核苷酸序列以及其推导出的蛋白氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *OsPra2* gene

GDSAVGK: GTP/GDP binding domain; NKAD: enhancing guanine binding domain; DTAGQE: coordinating β - and γ -phosphate group of GTP domain; EASA: facilitating guanine binding and dissociating domain; YYRGA: common domain of Rab family

2.2 水稻 *OsPra2* 蛋白主要定位在细胞膜和细胞核

用基因枪将质粒 pBI221*OsPra2::GFP* 转化进入洋葱表皮细胞中, 在 35S 启动子的驱动下, *OsPra2::GFP* 蛋白在洋葱表皮细胞中表达, 用共聚焦激光扫描显微镜观察其在细胞中的定位。结果显示 *OsPra2::GFP* 融合蛋白主要定位在细胞核和细胞膜上(图 3), 这与其在细胞中的功能是相符合的, 作为一个小 GTPase 结合蛋白, 一种信号分子, 一般都是结合到膜上发挥其信号传递作用。

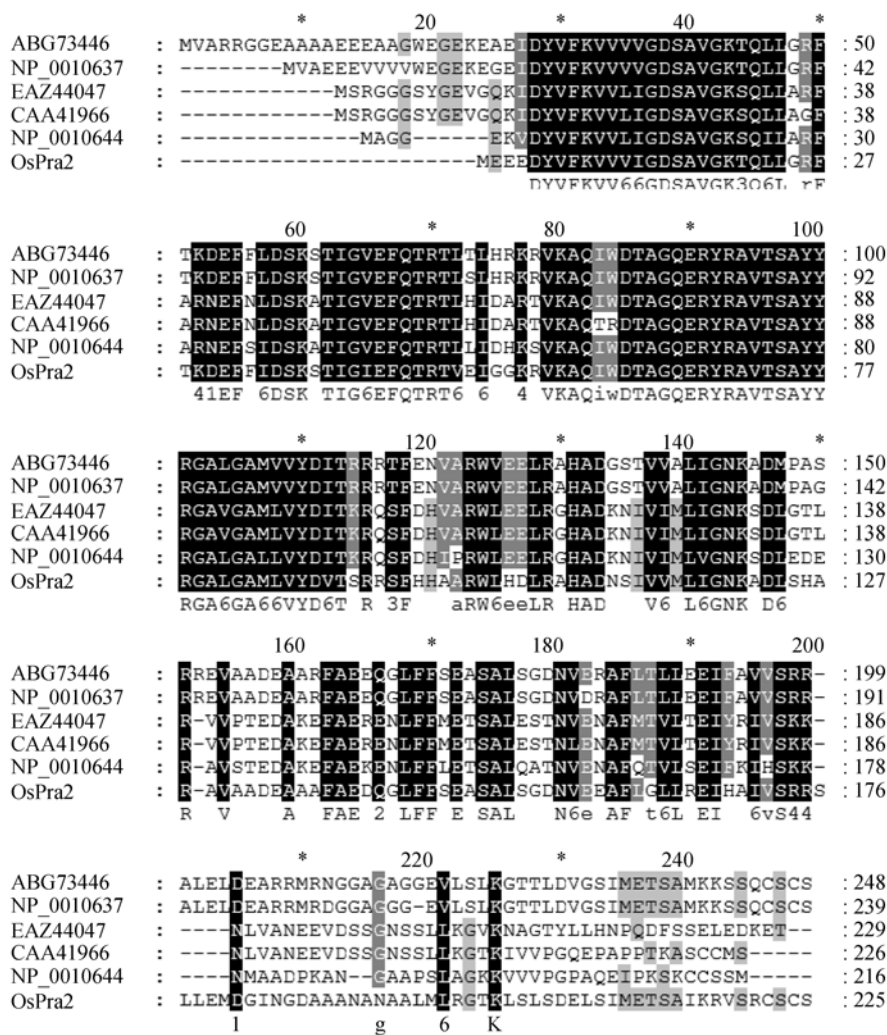


图 2 水稻 OsPra2 蛋白结构域的保守性分析

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequence of OsPra2 with its homologues
Highly conserved domains among six different rice Rab family proteins are illustrated. GDSGVGKS, DTAGQE, and NKAD are shown in shaded letters

2.3 水稻 OsPra2 的转录在胚芽鞘的细胞中比较明显

对 OsPra2 启动子驱动 GUS 报告基因的转基因水稻苗进行 GUS 染色来观察 OsPra2 转录的时空特异性, 发现 OsPra2 转录主要在胚芽鞘中, 茎和根的结合部及根中也有少量表达(图 4)。

2.4 水稻 OsPra2 的过量表达导致了水稻株型的矮化和种粒变小

本试验共获得 10 个独立的过表达 OsPra2 基因的转基因株系, 所有这些转基因植物的表型都发生了显著的变化, 植株变矮、叶子短且窄、种子也变小, 总体观察是按比例缩小, 对 OsPra2 过表达株系 O3、O6 进行了仔细的表型观察(图 5)。提取转基因和对照组水稻的 RNA, 用半定量 RT-PCR 检测 OsPra2 基因在水稻植株体内的表达水平, 结果显示

OsPra2 在 35S 启动子的作用下表达量明显升高(图 6)。

从水稻表型的变化和 OsPra2 的表达量的相关性可以推测 OsPra2 在控制水稻植株高低和种粒的大小上可能起重要的作用。

2.5 OsPra2 过表达对 BR 合成途径的影响

用 RT-PCR 方法对野生型水稻植株和过表达 Ospra2 的水稻植株中的 BR 合成过程中的 6 个 Marker (Oswarf、Oscpd、D2R、OSBR11、D11、OsBrL1) 的表达量进行了半定量测定。发现 OsPra2 过表达型水稻植株中参与 BR 合成的 3 个 Marker 表达量相对于野生型水稻都有不同程度的升高(图 7), BR 作为一种植物激素在植物的生长发育形态建成中发挥着重要的作用, 能影响植株的高矮, 种粒的形状等植物的表型。水稻 OsPra2 过表达基因型所呈现的明显的表型变化与 OsPra2 影响水稻的 BR 合成途径有关。

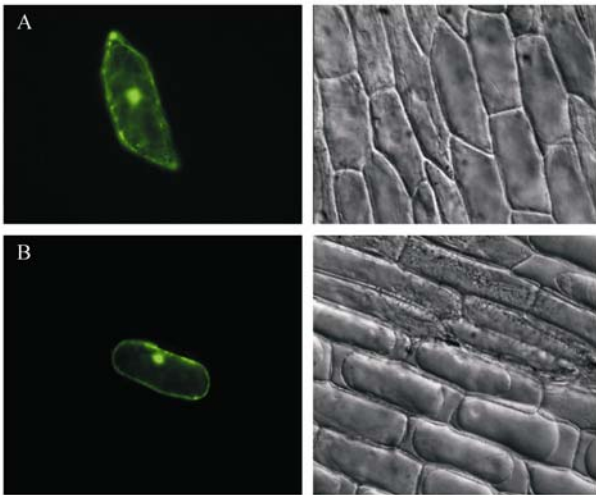


图 3 OsPra2 荧光蛋白的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of OsPra2-GFP protein

(A) the OsPra2-GFP is localized in the nucleus and on cell membrane; (B) the OsPra2-GFP is still localized in the nucleus and on cell membrane not on cell wall after plasmolysis under the sucrose concentration of 30% for 10 minutes



图 4 OsPra2 启动子转基因型水稻苗期植株 GUS 染色

Fig. 4 GUS staining for rice seedling of OsPra2 promoter::GUS transgenic plant

The GUS stain is indicated by the arrow

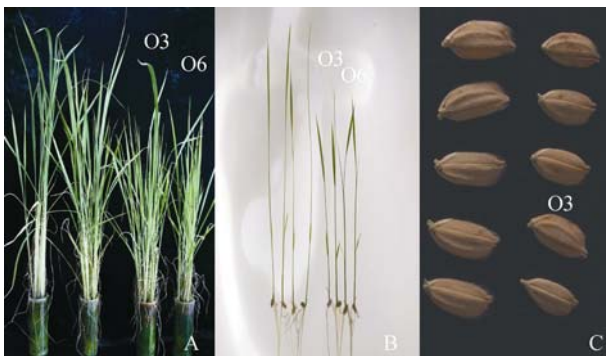


图 5 OsPra2 过表达转基因水稻呈现植株矮化、种粒变小

Fig. 5 Phenotype of the OsPra2 over expression transgenic plants

(A) gross morphology of wild-type plants (left), and the OsPra2 transgenic plants (right) after 2 months growth; (B) gross morphology of wild-type seedlings (left) and the OsPra2 transgenic seedlings (right) after 3 weeks growth; (C) grain morphology of the wild type (left) and the OsPra2 transgenic plants (right); O3 and O6: two independent OsPra2 overexpression transgenic lines

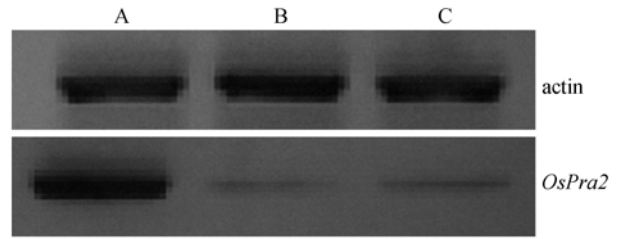


图 6 OsPra2 过量表达转基因株系 mRNA 水平检测

Fig. 6 mRNA expression level test for transgenic lines of OsPra2

(A) OsPra2 over expression transgenic plant; (B) the transgenic plant with vector of pCambia1300 as controls; (C) wild type

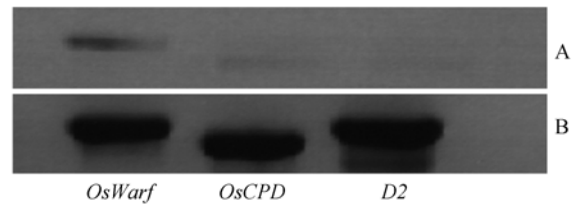


图 7 OsWarf、OsCPD 和 D2 在 OsPra2 过表达以及野生型水稻的表达情况检测

Fig. 7 Expression pattern of OsWarf, OsCPD and D2 in wild type plants and OsPra2 over expression transgenic plants

(A) the transgenic plant with vector of pCambia1300 as controls; (B) OsPra2 over expression transgenic plant

OsWarf: catalyzing 6-DeoxoCS→CS; OsCPD: catalyzing 6-DeoxoCT→6-DeoxoTE; D2: catalyzing 6-DeoxoTE→6-Deoxo3DT

2.6 OsPra2 蛋白与 P450 蛋白没有相互作用

豌豆中 Pra2 是通过和下游效应因子 DDWF1 (P450)相互作用促进 BR 的生物合成的, 因此本研究克隆了水稻中 DDWF1 的直系同源基因 P450, 然后用酵母双杂交的方法检测 OsPra2 和 P450 的相互作用。pDBLeu-OsPra2 和 pPC86-P450 分别单独转化进入 Mav203 酵母感受态细胞中, 然后接种到 3AT 浓度是 100 mmol/L 的 Sc-Trp-His 选择培养基上没有发现生长菌落, 证明这 2 个载体没有编码自激活的蛋白, 适合用来做酵母双杂交。再将上述 2 个载体共转化进入 Mav203 酵母感受态细胞中。接种到相应的 4 种选择培养基上, 培养观察, 并没有观察到相应的报告基因的表达。酵母双杂交实验显示 OsPra2 蛋白和预测的与豌豆 DDWF1 直系同源的水稻 P450 蛋白没有相互作用。

3 讨论

Rab 蛋白通过调节与植物的生长发育和形态建成, 膜泡运输, 抗逆等生命过程中的相关基因表达

发挥作用^[9,10]。豌豆小 G 蛋白 Pra2 的启动子中含有一个 12 bp 受暗环境诱导的顺式序列^[8], 暗诱导表达的 Pra2 通过和下游效应因子 DDWF1(P450)互作促进 BR 的生物合成, 进而影响下胚轴的伸长。与豌豆同源的水稻小 G 蛋白 OsPra2 的启动子中并没有类似豌豆 Pra2 启动子中的暗诱导顺式因子, 研究中也并没有发现该启动子受光的负调控, 但是对 OsPra2 启动子驱动 GUS 报告基因的转基因水稻苗进行 GUS 染色时发现 OsPra2 启动子在胚芽鞘以及茎和根的结合部和根部表达比较明显。35S 启动子驱动的过表达 OsPra2 基因的转基因水稻与野生型日本晴水稻相比, 表现出按比例缩小的株型, 类似 BR 缺陷型植株。

对转基因水稻中 OsPra2 基因的表达检测显示其 mRNA 的水平远远高于转化空载体的转基因植物和野生型日本晴水稻, 但是高水平的 OsPra2 基因表达并没有使得转基因水稻变高大, 反而使之表现出类似 BR 缺陷的植物株型。对转基因水稻中多个激素代谢途径中的酶类的表达进行检测, 结果显示: 过表达 OsPra2 基因转基因水稻中有 3 个 BR 代谢途径中的酶的表达量提高。由于在豌豆中 Pra2 是通过和下游效应因子 DDWF1(P450)相互作用促进 BR 生物合成的, 因此克隆了水稻中 DDWF1 的直系同源基因, 并使用酵母双杂交技术对水稻中的 OsPra2 蛋白和相应的 P450 蛋白的互作进行了验证, 结果显示二者不能相互结合, 尽管这个结果与在豌豆中得到的结果不相同, 但是却与过表达 OsPra2 基因的转基因水稻株型缩小的表型更相符合。根据这些实验结果进而推测, 在水稻中过表达 OsPra2 基因不但不能提高 BR 的合成, 相反可能降低该激素的合成, 植物体内较低的 BR 水平导致转基因水稻的株型缩小, 并且反馈激活了 BR 合成途径酶类的表达。显然, 尽管来自水稻的 OsPra2 蛋白基因与豌豆中的 Pra2 蛋白基因的序列同源, 作用机制却有可能不同, 但是由于技术的问题, 现在还不能确切地检测转基因水

稻中 BR 的实际水平, 所以只能从植物表型来推测, 关于水稻中 OsPra2 蛋白、P450 蛋白以及 BR 合成水平三者之间的关系还需进一步的试验证明。由于 OsPra2 基因的表达与植物的株高和种子大小直接相关, 因此对其功能及调节机制的深入了解不但有助于了解植物决定株高的一个途径, 也利于研究者利用该途径达到改造水稻农艺性状, 提高产量的目的。

REFERENCES

- [1] Kahn RA, Der CJ, Bokoch GM. The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J*, 1992, **6**(8): 2512–2513.
- [2] Armstrong J. How do Rab proteins function in membrane traffic. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**(3): 303–307.
- [3] Yang Z. Small GTPase: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, 2002, **14**(1): S375–S388.
- [4] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP binding proteins. *Physiol Rev*, 2001, **81**(1): 153–208.
- [5] Ma H. GTP binding proteins in plants: new members of old family. *Plant Mol Bio*, 1994, **26**: 1611–1636.
- [6] Verma DPS, Cheon CI, Hong Z. Small GTP binding proteins and membrane biogenesis in plants. *Plant Physiol*, 1994, **106**(1): 1–6.
- [7] Vanessa V, Horton AC, Yang ZB, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, **131**(3): 1191–1208.
- [8] Kang JK, Yun J, Kim DH, et al. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell*, 2001, **105**(5): 625–636.
- [9] Takashi U, Noriyuki M, Toyoaki A, et al. An *Arabidopsis* gene isolated by a novel method for detecting genetic interaction in yeast encodes the GDP dissociation inhibitor of Ara4 GTPase. *Plant Cell*, 1996, **8**(11): 2079–2091.
- [10] Alexander M, Yehoram L, Budhi S Tiwari, et al. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein *AtRab7* (*AtRabG3e*). *Plant Physiol*, 2004, **134**(1): 118–128.
- [11] Bolte S, Schiene K, Dietz KJ. Characterization of a small GTP binding protein of the rab5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol Biol*, 2000, **42**(6): 923–936.