

水稻盐胁迫相关基因 *sos5* 的克隆与序列分析

杨献光, 梁卫红, 姬生栋

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 采用 RT-PCR 扩增的方法, 从水稻(*Oryza sativa*) 中克隆获得了 1574 bp 的 cDNA 片段。基因测序和序列同源性分析结果表明, 所克隆的基因片段包含 1284 bp 的开放阅读框, 编码一个含有 427 个氨基酸的多肽, 该蛋白与拟南芥 SOS5 蛋白同源性达 45.6%, 与小麦同源性达 71%。

关键词: 水稻; 盐胁迫基因; RT-PCR; 序列分析

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1004 3268(2007)09 0014 04

Cloning and Sequence Analysis of A *Salt Overly Sensitive 5* Gene in Rice (*Oryza sativa*)

YANG Xian guang, LIANG Wei hong, JI Sheng dong

(School of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The cDNA fragment of a *salt overly sensitive 5* gene in rice (*Oryza sativa*) was amplified using RT-PCR technique. The PCR primers were designed according to the blast sequence of SOS 5 from *Arabidopsis*. The fragment was further cloned and sequenced. The result showed that the full length of cDNA sequence was 1574 bp, including an ORF of 1284bp, which encoded a peptide of 427 amino acids. Compared with the deduced amino acid sequences from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*, the identity were 71% and 45.6%, respectively.

Key words: *Oryza sativa*; Salt stress gene; RT-PCR; Sequence analysis

土壤盐害不仅严重危害着农业生产, 而且导致生态环境的恶化, 是造成全球粮食作物减产的重要原因^[1]。在许多地区, 干旱和盐渍化面积迅速扩大, 估计到 2050 年将有 50% 的可耕地面积严重盐渍化。土壤盐害主要表现为渗透胁迫, 可以导致植物发生一系列形态学、生理学、生物化学和分子水平的变化, 破坏细胞的正常离子分布和动态平衡, 影响植物的生长发育和产量^[2~4]。

美国亚利桑那大学植物科学系 Jiankang Zhu 博士利用快中子轰击、T-DNA 插入失活或 EMS 诱变等遗传突变分析手段处理模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 得到了 5 组 SOS (盐胁迫) 突变体, 进而克隆到 5 个 *sos* 相关基因, 即 *sos1*, *sos2*, *sos3*, *sos4* 和 *sos5*^[3,5]。其中 *sos5* 基因编码区

为 1263 bp, 不含内含子, *sos5* 基因编码一个含有 420 氨基酸残基的多肽, 如果其 1043 位上碱基 C 突变为 T (对应 SOS 5 蛋白中 Ser348 突变为 Phe), 就形成 SOS5 突变体^[6]。本研究利用 RT-PCR 技术, 从水稻中同源克隆到了一个 SOS5 家族成员, 并初步研究了该基因在水稻基因组中的组织结构等生物信息学特性, 为进一步研究其在渗透胁迫应答中的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

水稻品种日本晴 (*Oryza sativa japonica*) 由河南师范大学生命科学学院保存。播种于蛭石中, 灌溉 Hongland 营养液, 待长至两叶一心时取叶片, 提

收稿日期: 2007 03 19

基金项目: 河南省科技攻关项目(0624440060); 河南省青年骨干教师资助计划(521697); 河南师范大学科研启动费支持课题(052055)

作者简介: 杨献光(1980), 男, 河北邯郸人, 硕士, 主要从事分子生物学研究。

取细胞总 RNA。

1.2 PCR 引物的设计

利用拟南芥 *sos5* 基因(Gen bank 登录号为 At3g46550)的序列进行同源性检索,然后根据水稻同源 cDNA 序列设计 1 对引物。上游引物(P1)序列为: 5' - TCCTCTTCTCCTCGCTTACT - 3'; 下游引物(P2)序列为: 5' - CCAAAACGAACAGCAGCATG - 3'。预计扩增片段长度为 1550bp。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

总 RNA 抽提采用生工 SK1321 试剂盒进行。紫外分光光度法及变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及完整性。cDNA 第一链的合成按照 Promega M - MLV 说明书进行。

1.4 PCR 扩增、PCR 产物的克隆及序列测定

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应程序为 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 58℃复性 45s, 72℃延伸 1.5min, 30 个循环, 然后 72℃延伸 10min。

胶纯化回收 RT - PCR 反应产物, 与 pGEM - T Vector 连接后转化至大肠杆菌 DH5α 菌株, 经蓝白板筛选、EcoRI 酶切鉴定后的阳性克隆子送交上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 序列分析

测序结果采用 Blast 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性搜索, DNA 序列及氨基酸序列采用 DNAsar 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 水稻 cDNA 的分离和鉴定

以水稻总 RNA 为模板, oligo(dT)18 为引物反转录合成总 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到清晰的目的条带, 大小约 1560 bp(图 1), 回收、与测序载体连接后测序。

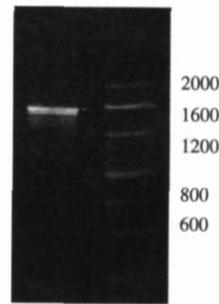


图 1 水稻 *sos5* cDNA 的 RT-PCR 产物电泳图

2.2 序列测定及测序结果的同源性比对

序列测定结果表明, 该克隆长 1574bp, 包含一个 1284bp 的开放读码框, 编码一个含有 427 个氨基酸的多肽, 其 5' 端非翻译区长 66bp, 3' 端非翻译区长 224bp(图 2)。在 GenBank 中经比较发现, 它

1	TCC TCT TCT CCT CGC TTA CTC CTC AGT CCC CCA CCC ACC ACC CCA GTT GCT CCC CCC GCT	60
61	GGC GAG ATG CGG GGC GGA GCG GGA GCC CTT CCG GTG CCA GGC GGC CTC GCG CTC GGG GTG	120
121	GTG CTG CTT CTA GTT CTC GCC GTG CTG CCG TCC CGG GCG GCC GGG GTG AAC GTG ACG GCC	180
181	GCG CTC GCG GCT TTC CCC AGC TTC GCC GAC TTC GCG CGG CTT CTG GAG TCG AGC CCG GTG	240
241	GCC GGG GAG ATC GCG GCG GCG TCG TCG CTG ACG CTG CTG GCC GTG CCG AAC AAC AAC CTG	300
301	CCG CGC TCG CCC TCG GCG TTC GCG GCG GCC TCC GGC GCC GAC ATC GCC GAT GTG CTG CGG	360
361	TAC CAC GTC CTG CTT GAG TAC CTC TCC CCT TCT GAC CTC GCG CGC CTC CCC GCC TCC GGG	420
421	AAG CTC GTG ACG ACG CTG TTC CAG ACC ACC GGG CGC GCG CCC TCC GAT CTC GGC GCC GTC	480
481	AAC CTC ACC GTC GGG GGA AAC TCC ACC GTC GTG GTC CGG TCG CCG GCG CCT TTC CCG GGG	540
541	TCG AGC GCC ACT GTC CTC GGC GCC GTC ACC GCT GTG CCT TAC AAC CTC AGC GTG CTC GCG	600
601	GTG GGT GGC CTC ATC GTC CCC TCC GGG CTD GAC GTC GCG GCC TCC GAC AGC CGC CCG GCC	660
661	GGT GGC GTC AAC ATC ACC CAC GTC CTC GCG GAC GCG CGG GGG TTC AAC GTT GCT GCC TCC	720
721	ATG CTG GAG GCA TCG GGC GTC GCG GAC GAG TTC ACG GCA GAC GAG CGC GGC GCC GGC ATC	780
781	ACC GTC TTC GTG CCC ACC GAC GAC GCC TTC GCC GAC CTC CCC GCC ACC GAC CGC CTC CAG	840
841	TCC CTC CCC GCA GAT CGC AAG GCC ACC GTG CTT CGC TTC CAC GTG CTG CAC TCG TAC TAT	900
901	CCG CTC GGC TCC CTC GAG TCC ATC GTG AAC CCC GTG CAG CCC ACG CTC GCC ACC GAG CGC	960
961	TTC GAG GCC GGC CAG TTC ACG CTA AAC ATC ACA CGG GTC AAT GGC TCC GTC GCC ATC GAC	1020
1021	ACC GGC ATC GTG CAG GCT TCG ATC ACC CGC ACG GTG TTC GAC CAA AAT CCC GTT GCG GTG	1080
1081	TTT GCC GTC TCG AAG GTT CTA CTG CCC AAG GAA ATG TTC GGT CGG GGC GGT GCT GAT AGC	1140
1141	GAC GTC ATG GCG CCG CCG CCG GAC GCG ATG GCG CCA GAT GCT GCC GAG AAC GTG CGG ACG	1200
1201	CCG CCG ACG AGA CTG TCG TCA CCT CCA GCA CTG CCG GGT GGC GCT GAT AGT GAG TCG TCA	1260
1261	TCA GCA TTG TCA ACG GCA AGG GCT GTC AAT TGG TGG TGT ATA CGG TTG GTG CTC CTA AAT	1320
1321	CTG CAT CTC TTA CTA CTA CCT CTG GTA TGA GAT CCG GAT GTT ACC CAT TGC TCG CTT CAT	1380
1381	TTTGCTCAATTTTGTCTCTGTTACTATTTCCCAATTTTAGAATGTGTACTACGGGA	1440
1441	ATGTGATGGGTAGAGAAATTTATAGGGGCAAAAGCAGTACGAATTTGTCCTACTTCTTTA	1500
1501	TTAGTTTTAACGAAATAATATCATGTGTAGAGAGACCTATGAACCTACTGTTCCTAAA	1560
1561	CGAACAGCAGCATG	1574

图 2 水稻 *sos5* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列(加粗序列为 ORF)

定位在水稻 1 号染色体上,同普通小麦、拟南芥等其他植物中的该基因的核苷酸序列同源性分别为 68.3% 和 42.5%; 这些结果表明,所得克隆即为水稻 *sos5* 基因的 cDNA 克隆。

2.3 编码氨基酸序列同源性及系统进化分析

利用生物信息学软件 DNA Star 进行了编码蛋

白的预测,并将这些同源基因编码的推测蛋白序列与普通小麦、拟南芥等其他植物中的该蛋白进行多重比对分析,结果显示,这些蛋白序列同源性分别达到 71% 和 45.6% (图 3)。对水稻和普通小麦、拟南芥中 3 个蛋白序列做系统化分析,进一步显示出 3 种植物 SOS5 蛋白的进化关系,见图 4。

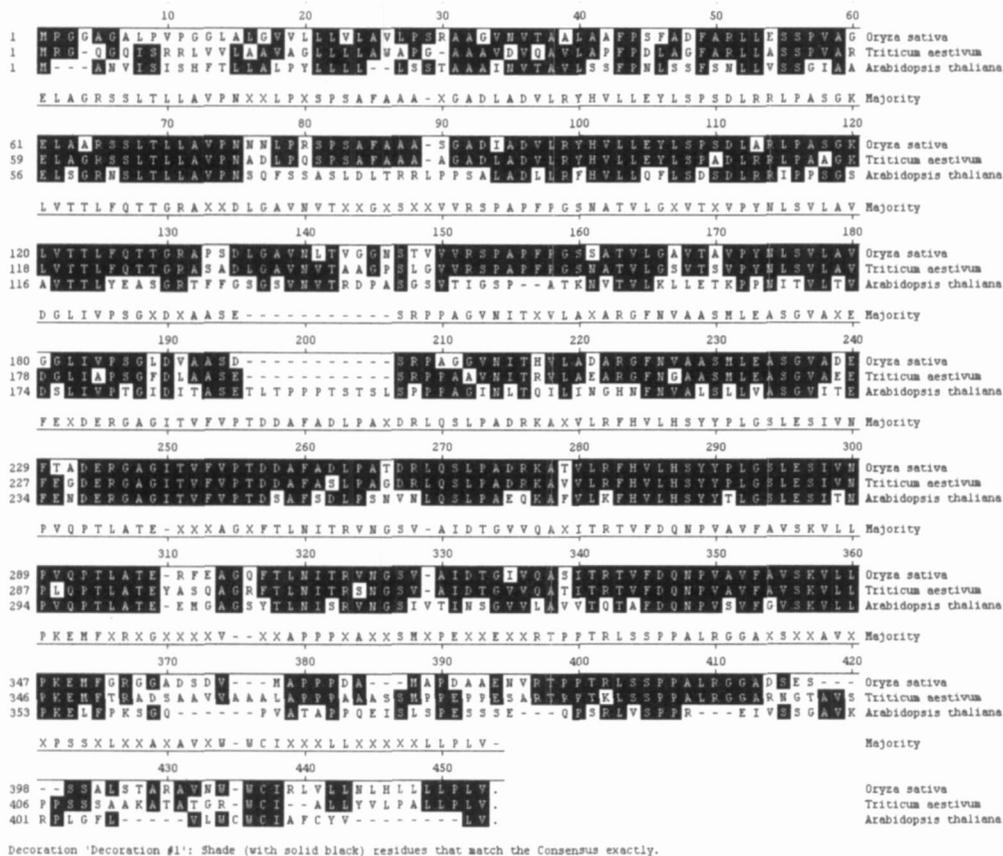


图 3 水稻 SOS5 预测蛋白的氨基酸序列与其他植物 SOS5 的同源性比对

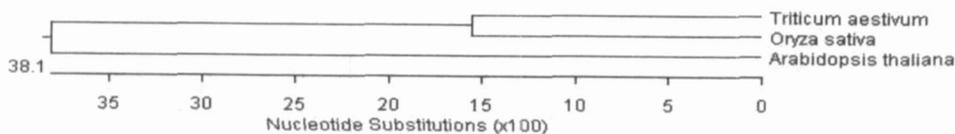


图 4 3 种植物 SOS5 蛋白的系统进化关系

3 小结

近年来,植物盐胁迫相关基因的克隆与转化取得了很大的进展,已经分离出许多植物抗盐基因,而且已经证实在抗盐功能方面具有重要的作用。例如, SOS 蛋白家族。在拟南芥 SOS 蛋白家族中, *sos1* 基因编码的 SOS1 蛋白是位于质膜上的 Na^+ / H^+ 反向运输蛋白,可以将细胞内的 Na^+ 排到胞外^[7]。位于细胞质中的 SOS3 和 SOS2 通过对质膜上 SOS1 的调控,实现细胞内外 K^+ , Na^+ 的离子稳态调节,增强抗盐性^[8]。SOS4 蛋白通过调节 SOS1

和其他离子转运蛋白活性及盐胁迫下根毛的发育,提高耐盐性^[9]。*sos5* 基因编码一个细胞粘连蛋白,广泛存在于植物各器官和组织细胞的质膜外侧,可以促进细胞壁发育,加强胞间连接,还可能参与植物授粉、胚发育等生物学功能。

本研究达到了预期目的,为进一步研究水稻 *sos5* 的功能奠定了基础。可以预见,进一步深入开展对 SOS 家族蛋白功能及其表达调控规律的研究,更全面地了解植物胁迫应答的生理生化机制,必定为人们更好地利用基因工程手段培育抗逆作物新品种提供新的思路。(下转第 20 页)

期施氮比例的“前氮后移”技术,并指出该技术可以提高小麦产量和强筋小麦籽粒蛋白质含量,改善品质^[11,12]。但也有人认为,“前氮后移”技术作为小麦高产的一项措施在专用小麦的生产中应做具体分析。对弱筋小麦,氮肥后移可导致蛋白质含量提高,品质降低;而且在施肥不足或肥力较低的情况下,减少前期追氮量,会导致减产及降低品质^[13]。本试验结果表明,在一般高产田,根据基础肥力差异,强筋小麦和弱筋小麦适宜的施氮范围为 150 ~ 225 kg/hm²(纯氮)。但根据不同类型专用小麦的专用特性和对小麦粉品质的特殊要求,强筋小麦和弱筋小麦在施氮水平及氮肥运筹上存在差异,在实际施肥中应区别对待:强筋小麦稳定氮肥用量,在 150 ~ 225 kg/hm² 纯氮范围内提高氮素用量,氮肥后移,减少底氮用量,加大追氮比例有利于提高强筋粉的综合品质,而以施纯氮 225 kg/hm²,基追比 4 : 5 : 1(基肥 : 拔节肥 : 孕穗肥为 4 : 5 : 1)调控效果最好;弱筋小麦在 150 ~ 225 kg/hm² 纯氮范围内适量减少氮肥用量,增加基肥比例,减少追肥比例,可明显促进弱筋粉综合品质的提高,而以施纯氮 150 kg/hm²,基追比 6 : 3 : 1(基肥 : 拔节肥 : 孕穗肥为 6 : 3 : 1)调控效果最佳。

参考文献:

- [1] Sanjeev K, Rajender K, Harbir S. Influence of time sowing and N P fertilization on grain quality of macaroni wheat (*Triticum durum*) [J]. Haryana Agric Univ J Res, 2000, 32(1): 31-33.
- [2] 徐阳春, 蒋廷惠, 张春兰, 等. 不同面包小麦品种的产量及蛋白质含量对氮肥用量的反应 [J]. 作物学报, 1998,

24(6): 731-737.

- [3] 赵广才, 常旭虹, 刘利华, 等. 施氮量对不同强筋小麦产量和加工品质的影响 [J]. 作物学报, 2006, 32(5): 723-727.
- [4] 杨丽珍, 赵广才, 常旭虹, 等. 高有机质土壤条件下施氮对强筋小麦产量及品质的影响 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(6): 60-64.
- [5] 赵淑章, 季书勤, 王绍中, 等. 不同施氮量和底追比例对强筋小麦产量和品质的影响 [J]. 河南农业科学, 2004(7): 57-59.
- [6] 戴廷波, 孙传范, 荆奇等. 不同施氮水平和基追比对小麥籽粒品质形成的调控 [J]. 作物学报, 2005, 31(2): 248-253.
- [7] 朱统泉, 李栋业, 徐喜凤, 等. 不同施氮量对弱筋小麦产量与品质的影响 [J]. 土壤通报, 2005, 36(6): 981-982.
- [8] 陆增根, 戴廷波, 姜东, 等. 不同施氮水平和记住比对弱筋小麦籽粒产量和品质的影响 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(6): 75-80.
- [9] 王月福, 于振文, 李尚霞, 等. 施氮量对小麦籽粒蛋白质组分含量及加工品质的影响 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(9): 1071-1078.
- [10] 朱新开, 郭文善, 周君良, 等. 氮素对不同类型专用小麦营养和加工品质调控效应 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 640-645.
- [11] Patel J R. Effects of levels and methods of nitrogen application on wheat yield [J]. Journal of Maharashtra Agricultural Universities, 1999, 24: 7-9.
- [12] 岳寿松, 于振文, 余松烈, 等. 不同生育时期施氮对冬小麦旗叶衰老和粒重的影响 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 42-46.
- [13] 李友军, 郭天财. 前氮后移施肥对冬小麦旗叶活性氧代谢和子粒产量的影响 [J]. 河南农业大学学报, 1997, 31(3): 221-225.

(上接第 16 页)

参考文献

- [1] Wang W, Vinocur Basia, Altman Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance [J]. Planta, 2003, 218: 1-14.
- [2] Zhu J K. Plant salt tolerance [J]. Trends in Plant Science 2001, 6: 66-71.
- [3] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 247-273.
- [4] Ward J M, Hirschi K D, Sze H. Plant pass the salt [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(5): 200-201.
- [5] Gong Z, Koiwa H, Cushman M A, et al. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (SOS) mutants [J]. Plant Physiology, 2001, 126: 363-375.

- [6] Shi H, Kin Y S, Guo Y, et al. The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion [J]. Plant Cell, 2003, 15: 19-32.
- [7] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6896-6901.
- [8] Guo Y, Halfter U, Ishitani M, et al. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1383-1399.
- [9] Shi H, Zhu J K. SOS4, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 585-593.