

水稻多逆境响应基因 *OsMsr8* 的克隆与表达*

黄 梅^{1,2} 崔延春^{1,2} 朱玉兴¹ 王曼玲¹ 夏新界^{1**}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所 长沙 410125; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 非生物胁迫是引起全世界作物减产的主要因素, 利用分子生物学技术提高作物耐逆性已成为作物改良的新途径。本课题组采用 Affymetrix 水稻表达芯片分析了超级稻亲本“培矮 64S”全基因组表达模式, 发现了众多逆境相关基因。*OsMsr8* 基因受低温、干旱等多逆境因子诱导, 在孕穗期干旱胁迫下表达水平显著上调。qRT-PCR 分析试验数据与芯片结果基本吻合。利用生物信息学方法对所获得序列进行开放阅读框、序列同源性分析, 预测了编码蛋白质产物的理化性质。该基因 ORF 全长为 834 bp, 编码 277 个氨基酸残基, 不含内含子, 无典型的基因保守结构域。在不同物种中有高相似性的蛋白, 功能未知。对启动子区域进行分析, 发现含有多钟与逆境诱导相关的调控元件, 推测该基因与植物耐逆性有一定关系。

关键词 水稻 逆境 基因芯片 实时定量 PCR 基因克隆

中图分类号: Q344+.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2010)03-0535-07

Cloning and expression of multi-stress responsive gene (*OsMsr8*) in rice

HUANG Mei^{1,2}, CUI Yan-Chun^{1,2}, ZHU Yu-Xing¹, WANG Man-Ling¹, XIA Xin-Jie¹

(1. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Abiotic stresses constitute a serious threat to agricultural production, which often develops into major crop production-reducing factors around the world. Molecular biology technology has, however, emerged as a promising vehicle improving crop tolerance. Using GeneChip Rice Genome Array (Affymetrix) to analyze global genome expression profiling of parent super rice “Pei'ai 64S”, we identified a large number of stress responsive genes. *OsMsr8*, which responds to drought and cold stresses, is highly induced in rice panicle. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) data are well in sync with micro-array results. Bio-informatic methods were applied to analyze the gene sequence and its protein production, including ORF, homologous sequences, and physical and chemical properties. The results show the gene with a 834 bp open reading frame and encoding 277 amino acids. *OsMsr8* gene lacks intron and typical conserved domains in its proteins. Also unknown homologous proteins exist in the different species. Analysis of putative promoter region identifies several regulatory elements related to stress response. *OsMsr8* might therefore be much related to rice stress tolerance.

Key words *Oryza sativa* L., Stress, GeneChip, Real-time PCR, Gene cloning

(Received Aug. 11, 2009; accepted Nov. 13, 2009)

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界最重要的禾谷类作物之一, 全世界约 40% 人口的主要营养来源于水稻。我国是水稻大国, 水稻种植面积平均占谷物播种面积的 26.6%, 稻谷总产占粮食总产的 43.6%^[1], 水稻生产在我国国民经济中具有极其重要的地位。农业生产中作物产量受各种非生物逆境因子如低温、高温、干旱、盐渍等的影响, 非生物逆境是造成粮食

减产的主要原因^[2], 可使主要粮食作物减产 50% 以上, 每年造成的损失达上亿美元, 严重影响了农业的可持续发展。各种非生物逆境因子可引起植物体内发生一系列的生理代谢反应, 如干旱胁迫可直接导致细胞缺水, 高盐、低温胁迫可改变植物体内渗透平衡, 导致植物吸水困难等, 表现为代谢和生长的抑制, 严重时甚至导致植株死亡^[3-5]。因此, 研究

* 中国科学院“百人计划”项目(02200420062903)资助

** 通讯作者: 夏新界(1959~), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为作物耐逆分子生物学。E-mail: jxxia@isa.ac.cn
黄梅(1983~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为作物耐逆分子生物学。E-mail: huangmei_sd@163.com

收稿日期: 2009-08-11 接受日期: 2009-11-13

水稻对逆境的适应机理, 发掘新的水稻耐逆基因, 应用生物技术培育出能适应暂时不利条件或者能长期生活在严酷条件下的水稻品种已成为当今育种学家研究的重点之一。

为适应环境, 植物在长期演化过程中形成了一系列对环境胁迫的抵抗或忍耐能力, 即植物的耐逆性。植物耐逆性是一个十分复杂的过程^[6]。随着分子生物学技术的不断发展, 人们对植物应答逆境胁迫的分子机理研究不断深入。植物对逆境胁迫的应答, 主要体现为其体内的生理生化变化, 这是由植物中大量与逆境相关基因的表达水平变化而引起的。植物中逆境应答相关的基因可分为两大类: 第一类是直接参与代谢与生理变化的效应基因, 它们通过控制代谢酶或蛋白的表达影响代谢与生理过程, 这些酶或蛋白对维持细胞膜系统在逆境下的稳定性以及防止原生质过度脱水等有重要作用, 如胚胎发育晚期富含蛋白(LEA)^[7]、脯氨酸合成关键酶基因 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合酶(P5CS)^[8-9]和鸟氨酸- δ -氨基转移酶(δ -OAT)^[10]、海藻糖合成酶基因海藻糖-6-磷酸合酶(TPS)和海藻糖-6-磷酸酯酶(TPP)等^[11]; 另一类是调节基因^[12], 它们通过控制或参与控制下游许多逆境诱导基因的表达而间接地影响代谢与生理过程, 如编码 DREB 转录因子的基因^[13-15]等。

基因组学(Genomics)的出现使生物学研究进入了一个新的时期。利用基因组学的方法不但可以挖掘大量的耐逆基因, 对其功能进行详细的研究, 还有助于全面理解植物的抗逆机理, 为利用遗传工程提高植物抗性提供了基础。通过基因工程手段, 采用重组 DNA 和转基因技术向栽培植物导入抗性目的基因, 增强其耐逆性, 使其能在干旱、低温、盐碱胁迫下正常生长^[16], 已发展成为改良植物耐胁迫性的新途径。

目前有关植物耐逆分子生物学研究取得了不少成就, 但对水稻的耐逆分子机制认识不够, 克隆的耐逆基因很少。因此, 以水稻为材料, 克隆更多新的水稻耐逆基因, 进一步探讨水稻耐逆的分子机理具有重要意义。采用基因芯片可以对水稻抗病虫、抗逆境、高产、优质等特异性相关基因进行检测与分离。目前, 本课题组已利用该技术完成了对超级稻亲本培矮“ ” 64S 全基因组表达模式的分析, 发现一批与逆境胁迫相关的基因。这些基因在不同胁迫处理下, 基因表达水平发生了显著变化。如基因 *OsMsr1*^[17]在孕穗期和抽穗开花期高温胁迫下, 叶中表达水平分别上调约 48 倍和 37 倍; 基因 *OsMsr4*^[18]在孕穗期低温处理下, 叶中表达水平上调达 60 倍; 基因 *OsMsr8* 在干旱处理下, 表达水平也发生显

著上调。本文对该基因进行了初步序列分析和功能预测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试水稻材料为超级稻亲本“ 培矮 64S ” (*Oryza sativa* L.)。供试试剂 DNA Polymerase (*TaKaRa LA Taq*)、克隆载体 pMD18-T 连接试剂盒、限制性内切酶购于宝生物工程(大连)有限公司, dNTP、DNA Ladder Marker 购于天根生化科技(北京)有限公司, PCR 引物由 Invitrogen 公司合成, 其他试剂均为分析纯。大肠杆菌感受态细胞 DH10B 为中国科学院亚热带农业生态研究所作物耐逆境分子生态研究中心实验室制备并于 -80 °C 保存。

1.2 试验处理及取样方法

种子用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min, 自来水冲洗 3 遍, 25 °C 浸种 3 d, 每天换水 1 次, 37 °C 催芽 2~3 d, 分批播于中国科学院亚热带农业生态研究所网室盆中, 当秧苗生长至 5 叶期时, 一部分作为苗期试验材料, 另一部分移栽至其他盆中, 每盆栽 5 株, 继续置网室自然条件下生长发育, 常规水肥管理与病虫害防治, 作为孕穗期与抽穗开花期的试验材料。每处理重复 3 次。

干旱胁迫: 秧苗生长至 5 叶期时, 倒去盆中水层, 置旱棚逐干, 当叶片开始卷曲 16 h 后取材, 对照也置旱棚, 但盆中保持水层。

高温胁迫: 秧苗生长至 5 叶期时, 将材料置于 45 °C 人工气候箱中(美国 Percival 公司生产的 PGC15.5), 待盆中泥水温度升至 45 °C 开始计时, 处理 2 h 后取材; 对照置于另一人工气候箱中, 温度为 28 °C。处理与对照均为黑暗条件。

低温胁迫: 发苗期处理为将材料置于 4 °C 人工气候箱中, 处理 12 h 后取材; 孕穗期与抽穗开花期处理为将材料置于 12 °C 人工气候箱中, 处理 16 h 后取材, 对照置于另一人工气候箱中, 温度 28 °C。处理与对照均为黑暗条件。

取材与制样: 每个处理与对照材料取 4~5 片倒 2 叶、4~5 个未抽出的幼穗或已抽出的开花穗中部, 剪碎, 液氮磨成粉, 立即分装入事先装有 1.0 mL TRIzol 提取液(Invitrogen)的 1.5 mL 离心管中, 每管中约装 100 mg 粉状样品, 低温记号笔编号, 盖紧, 摇动, 使样品与 TRIzol 提取液充分混合, 置 -80 °C 保存备用。

1.3 总 RNA 提取

采用 TRIzol 试剂盒提取, 按试剂盒说明书操作。用分光光度计计算其吸收峰后, 取 700 ng 进行电泳检测, 判断 RNA 质量。

1.4 基因芯片分析

按 Affymetrix 基因芯片系统中国经销商上海晶泰生物技术有限公司(GeneTech Biotechnology Limited Company)提供的 Affymetrix 表达芯片实验操作手册操作(2005 年版)。主要步骤包括: ①总 RNA 的提取和纯化; ②cDNA 的合成和纯化; ③体外转录合成 cRNA 和 cRNA 的纯化; ④cRNA 片段化、配制杂交液; ⑤芯片杂交; ⑥洗脱芯片; ⑦扫描芯片; ⑧数据分析。

1.5 实时定量 PCR 分析

用购于 Fermentas 公司的 DNase 处理提取的总 RNA 以去除混入的基因组 DNA(按厂家提供的方法操作)。采用 QIAGEN 公司的 SYBR Green RT-PCR One Step Kit (Cat. No. 204243)及 Roter Gene 3000 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 产物实时荧光检测。使用 Primer Expression 3.0 软件设计实时 PCR 引物, 目的基因引物为 *OsMsr8*-F: 5'-CGGCAGCGACAGCAAGGAG-3', *OsMsr8*-R: 5'-GTGAGAAAGCAGCGACGAACG-3', 扩增片段长 115 bp; 内参基因为 18S, 其引物为 18S-F: 5'-CGTCCCTGCCCTTTGTACAC-3', 18S-R: 5'-CGAACACTT CACCGGATCATT-3'。PCR 以不加 RT Mix (含反转录酶)作为参照, 以检测可能残留的 DNA。热循环设 48 30 min, 1 个循环; 95 10 min, 1 个循环; 95 15 s, 58 60 s, 40 个循环。按相对定量法计算, 目的基因相对表达量 $Rel. Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = \text{未知样品} \Delta Ct - \text{校准样品} \Delta Ct$, 未知样品 $\Delta Ct = \text{内参基因} Ct - \text{目的基因} Ct$, 校准样品 $\Delta Ct = \text{参比样内参基因} Ct - \text{参比样目的基因} Ct$ 。

1.6 cDNA 克隆

从 GenBank 中搜索到 *OsMsr8* 的序列, 应用 Vector NTI 10.3 软件分析设计该基因的 PCR 引物, 上下游引物分别设有 XbaI 和 PmaC 酶切位点, 上游引物 *OsMsr8*-F: 5'-TCTAGACATCCATCACTCGTTCGATCTCTCCC-3', 下游引物 *OsMsr8*-R: 5'-CA

CGTGTGTGTCGTGTCGTTCCCAGCC-3', 引物由 Invitrogen 合成, 以“培矮 64S”cDNA 为模板进行 PCR 扩增; 扩增程序为: 95 预变性 4 min, 94 变性 30 s, 57 退火 40 s, 72 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后在 72 下延伸 10 min。回收目的片段并连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌菌株 DH10B 感受态细胞, 筛选含有目的片段的阳性克隆, 送 Invitrogen 公司测序。

2 结果与分析

2.1 *OsMsr8* 的表达分析

为发现有效的耐逆功能基因, 本研究采用 Affymetrix 基因芯片系统与含 51 279 个水稻转录本的表达芯片(GeneChip Rice Genome Array), 分析了超级稻“两优培九”母本“培矮 64S”苗期、孕穗期、抽穗开花期的叶片与穗在高温、干旱、低温逆境胁迫下的基因表达, 筛选出部分显著上调或下调的基因。*OsMsr8* 是其中一个在低温、干旱、高温条件下, 在苗期、孕穗期、抽穗开花期叶片与穗中表达活性均比对照显著上调的基因。根据基因芯片分析结果, 其平均上调幅度为 42.35 倍, 最高上调幅度达 221 倍(低温), 最低上调幅度为 0.82 倍(图 1)。在不同时期和不同组织器官中, 与低温逆境胁迫下的表达倍数变化相比, 干旱逆境胁迫下的表达倍数变化更明显, 说明此基因对干旱逆境胁迫更敏感。在抽穗期, 低温逆境胁迫处理也使该基因在穗中的表达活性明显上调, 表明此时期的穗可能对低温较为敏感。

为验证芯片分析结果, 采用定量实时荧光 PCR 方法, 进一步分析 *OsMsr8* 的表达水平, 所得结果与基因芯片结果基本吻合(图 1), 均显示 *OsMsr8* 基因表达活性受干旱逆境因子诱导而升高, 同时在抽穗期受低温诱导而升高, 两组数据变化趋势基本一致。两组数据变化大小出现差异的原因可能是技术方法本身或所取植物材料的采集差异所引起的。

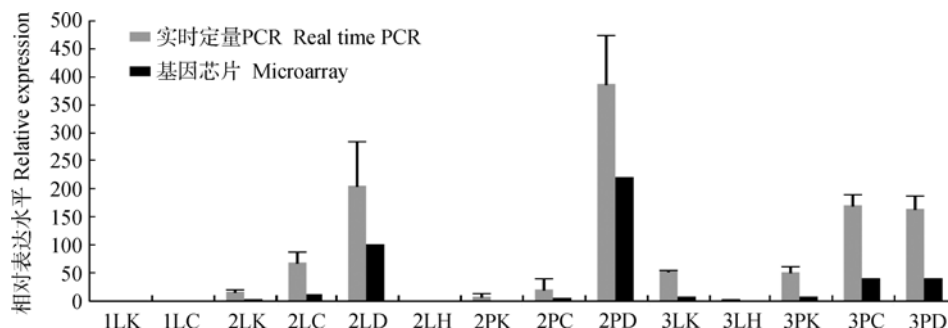


图 1 水稻“培矮 64S”不同生育时期与不同组织器官中 *OsMsr8* 基因在各逆境和正常条件下的相对表达水平

Fig. 1 Relative expression levels of *OsMsr8* in leaves and panicles of the indica “Pei'ai 64S” rice cultivar at different developmental stages under the various stresses and in normal growth conditions

1、2、3 分别为苗期、孕穗期和抽穗开花期; L 为叶片, P 为穗; K 为对照, C 为低温, H 为高温, D 为干旱。1, 2 and 3 is seedling, booting and heading stage, respectively; L, leaf; P, panicle; K, control; C, cold; H, heat; D, drought.

2.2 *OsMsr8* 基因 cDNA 的克隆

为进一步研究 *OsMsr8* 的结构及在水稻耐逆中的作用,本研究克隆了其 cDNA,以便深入分析该基因的功能。从 GenBank 中搜索到此基因的同源 cDNA 序列,设计基因特异性引物,以“培矮 64S”cDNA 为模板,PCR 扩增得到 *OsMsr8* cDNA 片段(图 2),连接到 pMD18-T 载体上。测序分析表明,*OsMsr8* cDNA 含 1 126 个碱基。序列分析发现,该序列的编码区位于碱基的 134~967,编码 1 个含有 277 个氨基酸残基的蛋白,预测分子量为 69.88 KD, pI 约为 4.77。与 Genbank 公布的“日本晴”的相应 gDNA 片段序列(AK107224, Range: 20925171~20926311)在两个位置存在碱基变化,且均是单碱基的变化(192: C 变为 A, 丙氨酸变为谷氨酸; 869: T 变为 C, 苯丙氨酸变为亮氨酸),相似性为 99.0%;与超级杂交稻亲本“93-11”(GenBank Number: AAAA02030434, Range: 14023-15163)相应 gDNA 片段的序列完全一致。因此推测这两个位置的碱基变化很可能是由水稻品种之间的差异造成的,并不是克隆或测序过程中碱基出错的结果。

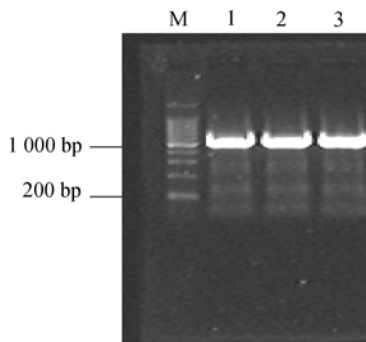


图 2 *OsMsr8* PCR 产物凝胶电泳分析

Fig. 2 Electrophoretic analysis of PCR products of the *OsMsr8* cDNA by PCR

M: 分子标记 Marker; 1~3: *OsMsr8* cDNA 扩增的 PCR 产物 *OsMsr8* cDNA PCR product.

2.3 *OsMsr8* 基因结构分析

为获得该基因的结构和可能的功能信息,采用 Vector NTI Advance 10.3 软件对此基因序列进行分析,找到其完整的 ORF,长度为 834 bp,编码 277 个氨基酸残基的蛋白。比较该基因的基因组序列和 cDNA 序列发现此基因没有内含子。*OsMsr8* 位于水稻 10 号染色体上,对基因组 10 号染色体上 *OsMsr8* 周围大约 10 kb 的碱基序列进行分析,发现 *OsMsr8* 距离其上游基因(AK103617)、下游基因(AK068549)的距离分别是 0.5 kb、0.7 kb,且与 *OsMsr8* 基因方向相同,见图 3。

根据公布的“培矮 64S”基因组 DNA 序列,对

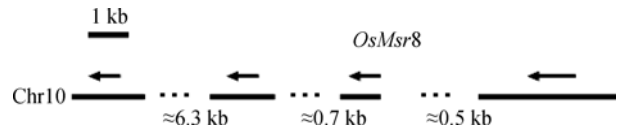


图 3 水稻 *OsMsr8* 及其周边基因在水稻“培矮 64S”10 号染色体上的排列分布

Fig. 3 Arrangement distribution of rice *OsMsr8* and its surrounding genes on “Pei'ai 64S” chromosome 10

OsMsr8 可能的启动子区域(该基因上游大约 2 kb 的核苷酸序列)进行在线 PlantCARE 软件分析(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),在启动子 TATA box 附近 2 kb 区域,发现 4 类与多种逆境诱导有关的顺式作用元件(图 4),其中包括 1 个光反应有关顺势作用元件 4cl-CMA2b、2 个脱落酸应答顺式元件 ABRE(ABA-Responsive Element)、1 个 TGACG-motif、1 个防御胁迫应答元件 TC-rich repeats。多个顺式调控元件共存反映出该基因可能的转录调控网络的复杂性。这些植物耐逆相关顺式作用元件的存在预示 *OsMsr8* 的启动子区域能够响应多种信号,其表达可能受多种反式作用因子共同调节。

为获得 *OsMsr8* 编码蛋白的可能功能信息,根据推测的此基因编码的蛋白质氨基酸(aa)序列,经蛋白质相似性比较得知(图 5):其全长序列与 9311 第 10 号染色体上的 *OsI_34555* 基因(CM000135)编码的预测蛋白质(EAY79423, Hypothetical protein) aa 序列完全一致,与水稻品种“日本晴”第 10 号染色体上的基因 *Os10g0548100*(AK107224)编码的氨基酸(BAF27138, Conserved hypothetical protein)序列一致性为 99%,与高粱第 1 号染色体上的相似基因(XM_002464941)编码的预测蛋白(EER91984, Hypothetical protein)的相似性为 73%,与玉米相似基因(EU953532)编码的预测蛋白(ACG25650, Hypothetical protein)的相似性亦为 73%。此外,其全长序列与毛果杨基因(NC_008481, Range: 10 439 772 ~ 10 440 819)编码的预测蛋白(EEF06053, Predicted protein)相似性为 41%,与蓖麻基因(EQ973781, Range: 2 267 364~2 268 222)编码的预测蛋白(EEF49085, Conserved hypothetical protein)相似性为 40%,与拟南芥第 5 染色体上的基因 AY049269 编码的蛋白(AAK83611, Unknown protein)相似性为 41%,与葡萄基因(CU459308, Range: 151 217~152 215)编码的蛋白(CAO49441, Unnamed protein product)相似性为 35%。所有基因编码的预测蛋白其功能均未知。

3 讨论

许多基因能同时被 ABA、干旱、高盐和低温或

其中几个胁迫因子诱导表达。如 *RD29A* 可同时被 ABA、干旱、高盐和低温诱导^[19], *CBF4* 受干旱和 ABA 的诱导, 却不受低温的诱导等。已有研究指出, 根据基因对逆境胁迫反应的时间可划分为 2 类, 一类是胁迫发生后迅速反应, 一类是胁迫发生后需一段时间后才反应。推测早期应答基因可能起保护细胞及扩大信号的作用, 而后期应答基因可能起使植物适应胁迫状态的作用^[20]。Seki 等^[21]分析干旱诱导基因的表达, 发现一类基因在干旱处理后 2 h 表达最强而后逐渐降低, 如 *Rd22BP1*、*DREB2A*, 这些基因可能调控信号的转导和基因的表达, 增强植物对胁迫的耐受能力。

利用基因芯片技术可以在植物中快速鉴定特异性基因, 寻找抗病虫、抗逆境、高产、优质等相关基因, 有利于进行新品种选育和品种改良。如 Rabbani 等^[22]利用 cDNA 微阵列和 RNA 点杂交的方法寻找由寒冷、干旱、高浓度盐和 ABA 诱导的水稻基因, 发现 73 个基因与上述逆境相关, 其中 58 个基因是未经报道的新基因。本课题组以“培矮 64S”为试验材料, 采用芯片技术进行表达分析, 发现许多新的逆境诱导基因, 如已报道的 *OsMsr1*、*OsMsr4* 等, 这些基因虽然都与逆境相关, 但之间也存在一定差异: *OsMsr1* 在苗期和抽穗期对高温、低温胁迫变化比较明显, *OsMsr4* 在苗期对低温胁迫变化显著,

```

-1513 AACTCTAGGAGTGAGTACATGAAATGCTGCAAAACCGTACAGATACTGAAATTGGCTGGGTAA-----
                                     enhancer
-1225 TTTCTCAACGGTAATTGGCATGCTACTTATTTAC-----
                                     CCAAT-box
-361 AAATCTTCTCACAACCA-----TGTAACCAATTGGTGACCTTTCAATTAGCA-----
                                     4cl-CMA2b          TATA-box          CAAT-box
-217 GAACCCAAAAGCACCCAACCTCAGCAGCCTAATGGAGATTCTCAAACAAGTGTCTAGAACCTTGTTT-----
                                     TC-rich repeats
-73 TTGACAACAAACACAGCCAAGGACGCCACCGTCACGGCGGC-----
                                     CGTCA-motif
-1 TCCTCCACGCTCGTAAAATAAACCCAAAGCGCGACACGCGCGCGCTCAGAGC-----
                                     ABRE
72 GCCACGCCGCGCGGCACCTGTGCCTTAAACCTCGCACTTGTTGTCCTTACGCTTCATCACC-----
   ABRE
261 ATGTCAGGCGGCGTAGGGCCGACGTGCGGGGCGGCATCACGCTGCCGTCGACGGGCGCGCCGCTCCCCCG
   M S G G V G P T C G G G I T L P S T G E P L P P
333 CTGCACCCGACGCCGACGTCGCGGCGCGGCCTCACCACCACTACTACCTCTTCTCCATCAAGCAGCTC
   L H P T P T S P T A R P H H H Y Y L F S I K Q L
405 AACTCGTTGCGCGCCGCGGCGCGCTGCTCGCCTTCTCCACCACCGTGCCACTCTCCGACATCGCCTTCGCCCTC
   N S F G A A A V L A F S T T V P L S D I A F A L
478 CTCGTCATCCCTTACCTCGTCTGCTCCTCTCCGCTTCTCCGCGAGAGGCCGCAAGCCCAACCCGGGC
   L V I P Y L V V L S V L A F P Q R P G K P N P G
550 GCGCCGCTTCTCTCGGCGCGGCGGCTTCTCTCTCAGGGCCACGACGCGCTCGGCTTCTCTGTCGCGGCC
   A P V F L G R G R F L L R A H D A L G F L V G A
622 GCGTCCCCGCGCTCTACATCTCGACGGCTCCGCTCGGGCGACACGGCGGGCGTCGCCGCGGCGTCCCCG
   A L P A L Y I L D G L R S G D T A G V A A A S P
694 CACGCTTCTCTCTCGCCGCGCAGATCTTTACCGAGGGCCTCGCCGCGGCGTGGCCCGGGAGGTTCTCCCTC
   H A F L L A A Q I F T E G L A A A W P G R F S L
766 CCCGTGCGTGCCGCGGTGGTGGTGTATGTACGGCGCGCGGAGGATGTTGCGGCGCTCGGAGTGCTCCGCCAG
   P V R A A V V V M Y G A R R M F A A S E W L R Q
838 GAGATGGAGAAGCGGGACAGTTTCGGCGGCGGCGTCCGCGGCGCGCCCGCCGTGGCGCGCCGAGGGTGGTG
   E M E K R D Q F G G G V G G A P A V A R R R V V
910 GCGGGGAGGGTGCTGGCGGTGCGGAACCTCGCTACTGCGGGATCAACCTCTTCGCTTCTCTGCTGCGGTTT
   A G R V L A V A N L A Y W G I N L F A F L L P F
982 TACCTGCCCAAGGCGTTCAACAGGTACTACTGCGGCAGCGACAGCAAGGAGGACGACGCCACCGCCGCCGCC
   Y L P K A L N R Y Y C G S D S K E D D A T A A A
1054 GCGGCCATTGACGCCGACGACGCAAGAAGAAGGATTCTAGAGTGTGTTTGATCGTTTCGCTGCTGCTTTC
   G A I D A D D A K K K D S *
TCACTCGCGTTTGTGAGCTTGGTGTATTAGCTCTTCTTCTTAATTTTTTTTTTCTTTTGAAAAATTCACGCATGTATT
AGCTCTTTTTTTTCTCGAAAATTTACGCATGTATTAGCTCAACTTGCGTTTCGTTTGGTGAAGAC

```

图 4 *OsMsr8* DNA 序列、推测的编码蛋白序列及预测的启动子区域顺式作用元件

Fig. 4 Sequences of *OsMsr8* DNA, *cis*-elements in the putative promoter region and the predicated protein

ATG 为翻译起始点, “*” 标示终止密码 TAG。4cl-CMA2b、TC-rich repeats、ABRE、TGACG-motif 分别为与光、防御胁迫、脱落酸及茉莉酸有关的顺式作用元件, “-----” 代表省略的碱基。ATG is the translation initiation site and “*” represents the stop codon (TAG). 4cl-CMA2b, TC-rich repeats, ABRE, TGACG-motif are *cis*-elements involved in light, defense, ABA and MeJA stress responses, respectively. “-----” represents bases omitted.

之间存在某种关联性,当然这需要更多的试验数据支持。

真核生物基因转录水平的调控受顺式作用元件和转录因子的协调作用,是表达调控的关键环节^[23]。植物基因启动子区域发现了多种重要的顺式作用元件,在转录水平上参与调控下游相应基因的表达,从而使植物应对不同的外界环境胁迫^[24]。许多脱水胁迫相关基因能被外源 ABA 诱导,在这些基因的启动区都发现了 ABA 的响应元件 ABRE^[25]。在 *OsMsr8* 上游可能的启动子区也发现有 ABRE 调控序列,但 *OsMsr8* 这种受多逆境因子诱导,不同发育时期、不同植物器官的不同表达模式是否与其特有功能相联系,值得深入研究和探讨。

参考文献

- [1] 赵国臣,侯立刚,隋朋举,等. 稻作栽培科学研究的回顾与展望[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(6): 3-5
- [2] Boyer J S. Plant productivity and environment[J]. Science, 1982, 218: 443-448
- [3] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [4] 郭洪海,孔令安,董晓霞. 盐胁迫下外源 Se 对杂交酸模耐盐性的影响[J]. 草业学报, 2001, 10(1): 20-25
- [5] 余玲,王彦荣,孙建华. 环境胁迫对布顿大麦种子萌发及种苗生长发育的影响[J]. 草业学报, 2002, 11(4): 79-84
- [6] Wang W X, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance[J]. Planta, 2003, 218: 1-14
- [7] Xu D P, Duan X L, Wang B Y, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HAV1*, from barely confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice[J]. Plant Physiology, 1996, 110(1): 249-257
- [8] Ingram J, Chandler J W, Gallagher L, et al. Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst[J]. Plant Physiology, 1997, 115: 113-121
- [9] Zhu J K, Hasegawa P M, Bressan R A. Molecular aspect of osmotic stress in plants[J]. Critl Rev Plant Sci, 1997, 16: 253-277
- [10] 吴亮其,范战民,郭蕾,等. 通过转 δ -OAT 基因获得抗盐抗旱水稻[J]. 科学通报, 2003, 48(19): 2050-2056
- [11] Jang I C, Oh S J, Seo J S, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth[J]. Plant Physiology, 2003, 131(2): 516-524
- [12] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, et al. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Gene Dev, 2003, 17: 1043-1054
- [13] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression[J]. Plant Journal, 2003, 33(4): 751-763
- [14] Tian X H, Li X P, Zhou H L, et al. *OSDREB4* genes in rice encode AP2-containing proteins that bind specifically to the dehydration-responsive element[J]. Acta Bot Sin, 2005, 47(4): 467-476
- [15] Chen J Q, Dong Y J, Wang Y J, et al. An AP2\EREBP-type transcription-factor gene from rice is cold-inducible and encodes a nuclear localized protein[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 972-979
- [16] Scrrano R, Gaxiola R. Microbial model and salt-stress tolerance in plant[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1994, 13(2): 121-138
- [17] 徐孟亮,陈荣军, Pedro R, 等. 一个新的水稻逆境响应基因 *OsMsr1* 的表达与克隆[J]. 作物学报, 2008, 34(10): 1712-1718
- [18] 王曼玲, Rocha R, 李落叶, 等. 水稻多逆境诱导基因 *OsMsr4* 的克隆与表达分析[J]. 生物技术通报, 2009(7): 68-75
- [19] 刘强,赵南明, Yamaguchi K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11-17
- [20] Ramanjuhi S, Bartels D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plant[J]. Plant Cell Environment, 2002, 25: 141-151
- [21] Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. The Plant Journal, 2002, 31: 279-292
- [22] Rabbani M A, Maruyama K, Abe H, et al. Monitoring expression profiles of rice gene under cold, drought, and high salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses[J]. Plant Physiology, 2003, 133: 1755-1767
- [23] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. Plant Cell, 1994, 6: 251-264
- [24] 聂丽娜,夏兰琴,徐兆师,等. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(3): 385-391
- [25] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways[J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 217-223