

一步法 RT-PCR 克隆水稻线粒体磷转运蛋白基因及其序列特征分析

王 峰, 黄璐圆, 王宏斌, 刘 兵, 王金发*

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 基因工程教育部重点实验室, 生命科学学院, 广州 510275)

摘要:以水稻广亲和品种 Cps1017 幼穗为材料, 用一步法 RT-PCR(逆转录聚合酶链式反应)克隆了一个长度为 1 118 bp 的编码线粒体磷转运蛋白的 *OsMPT* 基因。序列分析表明其包含了基因完整的编码序列, 编码由 368 个氨基酸组成的线粒体磷转运蛋白, 它与玉米、大豆、*Lotus japonicus*、*Betula pendula*、拟南芥的线粒体磷转运蛋白氨基酸序列相似率分别为 93.5%, 85.6%, 83.8%, 83.7%, 81.1%。氨基酸疏水谱分析显示它有线粒体磷转运蛋白家族高度保守的 6 个跨膜结构域。水稻线粒体磷转运蛋白 N 端富含精氨酸(Arginine)、丙氨酸(Alanine)和丝氨酸(Serine)。iPSORT 预测其蛋白 N 端具有定位于线粒体的信号肽序列, 进一步分析表明此编码区段有 6 个外显子和 5 个内含子。RT-PCR 结果表明, *OsMPT* 基因在水稻两个亚种粳稻和籼稻的叶片中均有表达, 在 Cps1017 营养器官和生殖器官中都有高水平表达。水稻线粒体磷转运蛋白的克隆和表达分析将为研究其结构和生物学功能奠定基础。

关键词: 水稻; 线粒体磷转运蛋白; 序列分析; 基因组结构; RT-PCR

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0303-07

Cloning and Sequence Analysis of Rice Mitochondrial Phosphate Transporter Gene by One-step RT-PCR

WANG Feng, HUANG Lu-yuan, WANG Hong-bin, LIU Bing, WANG Jin-fa*

(The State Key Laboratory of Biocontrol, the Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Gene-specific primers were designed according to the known sequence of mitochondrial phosphate transporter gene (*MPT*), and the rice *MPT* (*OsMPT*) cDNA fragment of 1 118 bp was cloned by One-step reverse transcription PCR (RT-PCR) from Cps1017, a wide-compatibility variety of rice (*Oryza sativa*). DNA sequencing analysis indicated that it carried an entire open reading frame and encoded a protein of 368 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of *OsMPT* showed similarities of 93.5%, 85.6%, 83.8%, 83.7% and 81.1% with those from maize, soybean, *Lotus japonicus*, *Betula pendul* and *Arabidopsis thaliana*, respectively. The hydropathy profiles of the deduced amino acid sequence predicted the existence of six membrane-spanning domains, which are highly conserved in the mitochondrial transporter family. The N-terminal amino acids were enriched with arginine, alanine and serine, and a signal peptide targeted in mitochondria was predicted by iPSORT. Further analysis of coding segment of *OsMPT* revealed that it contained 6 exons and 5 introns. The average length of introns and exons were 467 bp and 186.3 bp respectively; and the average GC content of introns and exons are 35.5% and 54.0% respectively. RT-PCR results showed relative high-level expression of *OsMPT* in leaves of both *japnica* and *indica* rices, so was in both vegetative and reproductive tissues of Cps1017. Cloning and expression analysis of *OsMPT* will provide a base for the researches of its structure and biological function.

收稿日期: 2005-01-19 接受日期: 2005-04-14

基金项目: 科技部植物转基因重大专项项目(J00-A-009); 国家自然科学基金项目(30370809)资助

* 通讯作者 Corresponding author

Key words: Rice; Mitochondrial phosphate transporter; Sequence analysis; Genomic structure; Reverse transcription-PCR

在产量、品质和抗逆性等方面各具特色的亚洲栽培稻的两个亚种是籼稻和粳稻,它们之间具有很强的杂种优势,但籼、粳稻 F_1 杂种结实率偏低且稳定性差、籽粒不饱满、生育期长、植株偏高和米质分离等是亚种间杂种优势利用的主要障碍。线粒体是真核生物能量代谢的主要场所,是糖、脂肪和氨基酸最终氧化放能的部位。前人大量研究表明植物的育性可能与线粒体的氧化磷酸化过程受到了某种程度干扰有关^[1-3]。线粒体磷转运蛋白位于线粒体内膜上,以同源二聚体的形式存在,它把无机磷(Pi)转运到线粒体基质,通过促进 Pi/H^+ 的同向运输以及 Pi/OH^- 的反向运输,从而对线粒体中将 ADP 氧化磷酸化成 ATP 有着重要的作用^[4,5]。植物的育性往往与线粒体的能量代谢状况有密切的联系,在营养生长阶段,细胞发育尚可忍受线粒体能量供应不足的状况,但在花粉生长时期对能量的需求大量增加,若线粒体来不及供给充足的能量,将导致花粉败育。磷是植物能量代谢、核酸合成以及生物膜的重要成分,并在光合作用和一些酶的调控过程中起着很重要的作用。本研究以具有广亲和特性^[6]的水稻优良品种 Cps1017 的生殖器官幼穗为材料,根据已知线粒体磷转运蛋白基因序列^[7]设计引物,采用一步法 RT-PCR 克隆磷转运蛋白 cDNA 序列,并分析该基因编码氨基酸的一些特征,同时对其表达模式进行研究,为进一步揭示水稻亚种间杂种不育的分子机理和利用基因工程改良植物耐低磷胁迫奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

所用水稻 (*Oryza sativa*) 品种包括广亲和品种 Cps1017, 粳稻 2 个品种: 中花 11 和丰锦; 籼稻 4 个品种: 粤航、珍紧占、广超丝苗、丰丝占。各品种叶片取自 16 h d^{-1} 光照、光照强度为 $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、28℃ 培养下的幼苗; 穗和种子取自在田间正常生长的水稻植株, 水稻愈伤诱导和继代在含有 2 mg L^{-1} 2,4-D 的 N_6B_5 培养基上进行。取材后迅速投入液氮并保存于 -70℃。大肠杆菌 DH5 α 为转化受体菌。Concert Plant RNA Reagent 购自 Invitrogen 公司; TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit 购自 Clontech 公司; ReverTra Ace 反转录酶和 RNase Inhibitor 为 Toyobo

公司生产; Oligo(dT)、胶回收试剂盒、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国公司; 限制性内切酶、DNA Marker、dNTP、 T_4 DNA 连接酶、克隆载体 pMD18 等购自 Takara 公司; PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 总 RNA 的提取

取材料 0.1 g, 加液氮, 用研钵研成粉末并转移到预冷的不含 RNase 的离心管中, 加入 500 μl 预冷至 4℃ 的 Plant RNA Reagent, 旋涡振荡重悬。室温静置 5 min, 室温 10 000 $\times g$ 离心 2 min, 转移上清液到不含 RNase 的离心管中。加入 100 μl 的 5 mol/L NaCl 混匀, 加入 300 μl 的氯仿, 颠倒混匀。4℃, 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上层水相; 加入等体积的异丙醇混匀, 室温静置 10 min。4℃, 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 倾去上清液, 加入 1 000 μl 75% 乙醇, 室温 10 000 $\times g$ 离心 1 min, 倾去液体, 加入 40 μl RNase free 的水溶解 RNA, 取 1 μl 于 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观测照相。同时取 2 μl 总 RNA, 用 DEPC 处理水稀释 100 倍, 分光光度计测 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 吸收峰值。吸取部分 RNA 用于 RT-PCR 反应, 其余储存于 -70℃ 备用。

1.3 一步法 RT-PCR 克隆水稻 *OsMPT* 基因

参考已知磷转运蛋白基因序列^[7]合成引物 P1: 5' ATGGCGCTCTCCGACCGCTC3', P2: 5' CTGCA-TAAGAATCAAGCACTGGC3', 采用一步法 RT-PCR 合成, 操作过程按 TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit 推荐的程序进行。取 1 μg 水稻幼穗总 RNA, 加入 5 μl 10 \times One-Step Buffer, 1 μl 50 \times dNTP Mix, 0.5 μl Recombinant RNase Inhibitor (40 units μl^{-1}), 25 μl Thermostabilizing Reagent, 10 μl GC-Melt, 1 μl Oligo (dT) Primer, 1 μl 50 \times RT-TITANIUM Taq Enzyme Mix, 引物 P1 和 P2 各 1 μl , 加 ddH₂O 至总体积 50 μl 混匀。设定扩增程序为: 50℃ 反转录 1 h, 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 68℃ 1.5 min 扩增 30 个循环, 最后再在 68℃ 下延伸 2 min。取 5 μl 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.4 PCR 产物的克隆及重组子鉴定

一步法 RT-PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 割胶回收目的片段, 并直接经 T/A 克隆连接入 pMD18 载体中, 用氯化钙法^[8]将连接产物转

化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过蓝白斑筛选,在涂有 100 mg L⁻¹ 氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上用牙签挑取白色单菌落,接入 400 μ l 含 100 mg L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,通过菌液 PCR 进行初步鉴定。菌液 PCR 反应体系为 20 μ l: 2 μ l 10 \times PCR 反应缓冲液(含 MgCl₂)、1 μ l 10 mmol/L dNTPs、1 μ l 菌液、0.5 μ l 20 μ mol/L 引物 P1/P2、1U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 再以 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 32 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 10 μ l PCR 产物电泳检测, 鉴定有无插入片段。将阳性克隆菌液加入甘油至终浓度 15%, -70 $^{\circ}$ C 保存。将有插入片段的克隆用碱裂解法提取质粒, 之后用 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切进一步鉴定确认。

1.5 DNA 序列及其编码氨基酸分析

经菌液 PCR 和酶切鉴定为阳性的克隆由上海博亚公司测定全核苷酸序列。用 Vector NTI Suite 6 软件分析核苷酸及其推导的氨基酸序列, 序列 BLASTTM 比较分析在 GenBank 数据库中进行。在 NCBI 网站上运行 BLASTN 后寻找与之高度同源的水稻细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 克隆, 记录 cDNA 与基因组 BAC 克隆的匹配情况, 同时对其中的可疑部分作适当的手工校正。用 ExPASy 的 ScanProsite 软件^[10] 对蛋白进行功能位点的预测, N 末端氨基酸信号肽的预测用 iPSORTTM 进行, 氨基酸疏水性分析用 ProtScale^[11] 进行。Clustal X (1.81)^[12] 和 GeneDoc 用来对蛋白序列进行多重序列联配分析。

1.6 两步法 RT-PCR 检测 *OsMPT* 的表达

根据测定的水稻线粒体磷转运蛋白基因序列设计跨越内含子的 RT-PCR 引物: 正义 P3: 5'CTCTGTGGGGTCGCCAAATCCCT3', 反义 P4: 5'GGGGCAAAAAAGACCTACTTACCT3', 看家基因 actin gene 引物为 P5: 5'AGAGCTACGAGCTTCC-TGATGGAC 3' 和 P6: 5'GAGAGATGCCAAGATG-GATCCTCC 3'。第一链 cDNA 合成体系为 20 μ l: 5 μ g 总 RNA, 1 μ l 5 pmol/L Oligo (dT), 4 μ l 5 \times Buffer, 2 μ l 10 mmol/L dNTP, 100 U ReverTra Acc, 20 U RNase inhibitor。反转录前先将总 RNA 和 Oligo (dT) 于 70 $^{\circ}$ C 预热 2 min 去除 RNA 的高级结构, 冰上放置 2 min 后于 42 $^{\circ}$ C 反转录 1 h, 取 2 μ l 单链 cDNA 产物进行 PCR 反应, *OsMPT* 基因和 *actin* 基因于同一 PCR 管内同时扩增, 反应体系同上。扩增

程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 10 s, 27 次循环。

2 结果和讨论

2.1 水稻幼穗总 RNA 的提取

经分光光度计测定, 提取水稻幼叶、幼穗和种子总 RNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 都在 2.0 左右, 浓度在 1-5 μ g μ l⁻¹ 之间, 说明总 RNA 的质量较好, 无蛋白质及小分子污染。幼叶和幼穗的总 RNA 含量相对丰富。经电泳检测, 观察 18S 和 28S rRNA 两条带的比例, 总 RNA 在提取过程中未降解。

2.2 水稻 *OsMPT* 基因 cDNA 的克隆及鉴定

采用一步法 RT-PCR 直接以水稻幼穗总 RNA 为模板扩增出了 1 条特异的目的产物(图 1), 大小在 1.1 kb 左右, 与预期大小一致。将一步法 RT-PCR 产物经制胶纯化后直接与 pMD18 载体连接, 转入 DH5 α , 挑取白色菌落, 少量培养后做菌液 PCR, 结果如图 2A, 能扩增出 1.1 kb 目的条带的初步鉴定为阳性克隆。将阳性克隆接种培养后提取质粒用 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切, 酶切结果如图 2B, pMD18 载体上外源插入片段的两端分别带有一个 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切位点, 阳性克隆能切出 1.1 kb 左右的外源插入片段和 2.7 kb 的载体片段。

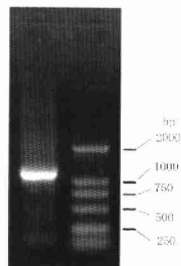


图 1 水稻线粒体磷转运蛋白基因 cDNA 的克隆

Fig. 1 Cloning of rice mitochondrial phosphate transporter gene

一步法 RT-PCR 试剂盒将 RT-PCR 反应中反转录(RT)和 PCR 两个步骤所需的反应成分以及引物一次性加入到同一 PCR 反应管中, 在 PCR 仪中一次完成 RT-PCR, 不用在反转录后再次往反应混合物中添加任何试剂, 在简化操作程序, 节省操作时间的同时, 还最大限度地降低了外来因素的污染。该法以 RNA 为起始材料很适合单个或少数基

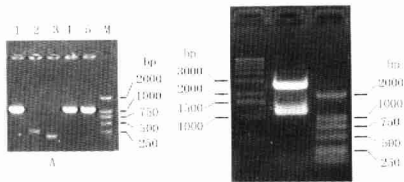


图 2 重组子的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinants

A: 外源插入片段的 PCR 鉴定。Identification of foreign inserted fragment by PCR; M: DL2000 DNA marker; 1-5 分别代表不同的克隆。1 to 5 represent different clones. B: 阳性克隆的酶切鉴定。Restriction analysis of positive clone.

因的克隆和分析,但是由于该法无第一链 cDNA 产物,因此在 RNA 样品比较少且需要对多个基因进行克隆和表达分析时,两步法 RT-PCR 则更有优势。

2.3 水稻 *OsMPT* 基因的序列分析

序列分析表明,基因总长度为 1 119 bp,包含完整的读码框,将测得的基因序列在 NCBI 上进行 BLASTN 分析,发现与 GenBank 中的核苷酸序列 AK069611^[4]和 AB016065^[4]分别相差 2 个碱基和 3 个碱基。这些差异没有导致保守氨基酸的改变,可能是由于水稻品种不同所致。用 Vector NTII Suite 6 及 ScanProsite 软件预测其编码由 368 个氨基酸组成的线粒体磷转运蛋白,分子量为 39.0 kDa,理论等电点为 9.36。它与玉米 (*Zea mize*) 线粒体磷转

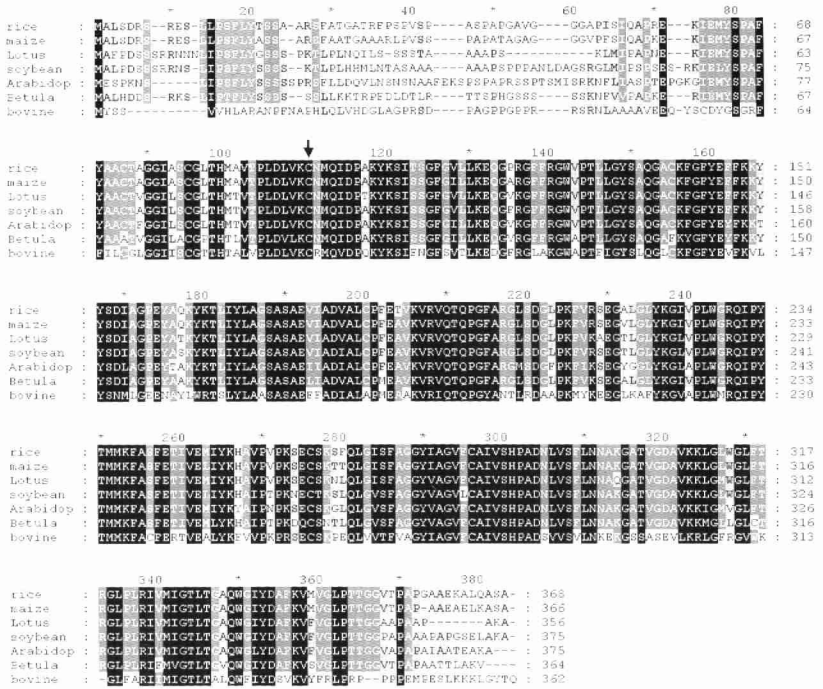


图 3 水稻与其他生物线粒体磷转运蛋白氨基酸序列的同源性分析

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of the mitochondrial phosphate transporters of rice and other organisms

黑色表示 一致氨基酸,灰色表示相似氨基酸,箭头所指氨基酸为 NEM 敏感的保守 Cys。Identity is indicated by a black box, and similarity by a grey box. The conserved N-ethylmaleimide reactive Cys is indicated by an arrowhead.

运蛋白(BAA31583)氨基酸同源程度最高(图3),一致率为91.3%,相似率达到93.5%,与大豆(*Glycine max*) (BAA31582)、百脉根(*Lotus japonicus*) (BAB83689)、桦树(*Betula pendula*) (CAA69726)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (NP_196908)和小牛(*Bos taurus*) (NP_777082)的线粒体磷转运蛋白氨基酸序列相似率分别为85.6%,83.8%,83.7%,81.1%,59.2%。线粒体磷转运蛋白家族有三个高度保守的内部重复单位,每个重复单位大概由100个氨基酸组成,包括两个跨膜结构域^[7,15-18],总共六个跨膜结构域。水稻线粒体磷转运蛋白氨基酸 Kyte and Doolittle 疏水谱预测^[12]如图4所示,跨膜区具有很强的疏水性,横线所示为线粒体磷转运蛋白家族拥有的保守的六个跨膜结构域。比较水稻、桦树和小牛线粒体磷转运蛋白氨基酸序列的疏水性,发现它们的氨基酸疏水谱基本一致,提示它们有相似的二级结构和生化功能^[7]。线粒体磷转运蛋白在其蛋白N端通常含有一个线粒体信号肽定位序列,小牛线粒体磷转运蛋白前49位氨基酸为定位于线粒体的信号肽序列^[10],在植物中也发现含有定位于线粒体的信号肽序列^[7,17,18]。水稻线粒体磷转运蛋白N端富含精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)和丝氨酸(Ser),而带负电的天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)很稀少,符合线粒体信号肽的特征^[19]。用iPSORT^[11]预测推导水稻磷转运蛋白氨基酸具有定位于线粒体的信号肽序列。

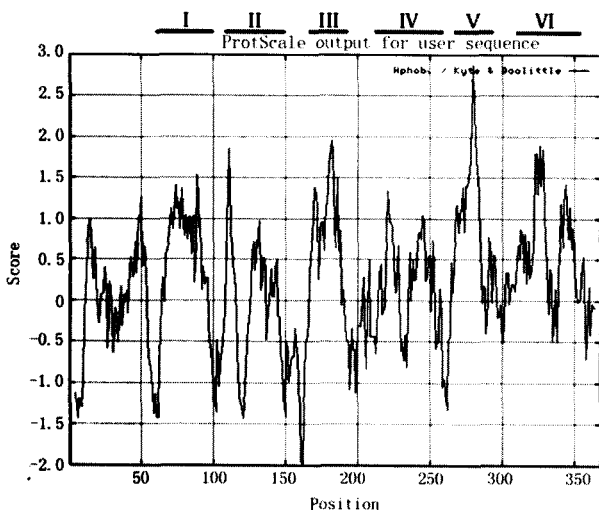


图4 水稻线粒体磷转运蛋白的疏水性分析

Fig. 4 Hydropathy profiles of rice mitochondrial phosphate transporter
横线表示六个跨膜结构域。The six putative transmembrane segments are indicated with horizontal lines and denoted by Roman numerals.

植物线粒体磷转运蛋白基因最早是 Kiiskinen 等人结合差异显示 RT-PCR 和文库筛选的方法从桦树中分离出来^[7],随后也从水稻、玉米、拟南芥、大豆^[7]、*Lotus japonicus*^[18]中分离出来。线粒体磷转运蛋白基因在桦树和 *Lotus japonicus* 中是以单拷贝存在,但玉米和大豆中以多拷贝存在。关于植物线粒体磷转运蛋白基因功能的研究很少,Takabatake 首次把来源于大豆的线粒体磷转运蛋白基因插入原核表达载体 pET-24d 在 BL21(DE3)中以包涵体形式进行表达,复性后对重组蛋白进行体外活性鉴定,发现其具有磷转运的活性^[7]。Nakamori 利用点突变将 *Lotus japonicus* 线粒体磷转运蛋白的保守半胱氨酸(Cys)残基替换成 Ser 和 Ala,发现替换成 Ala 会完全丧失活性,替换成 Ser 会造成活性显著下降,从而证明在植物中保守 Cys 残基可能位于催化活性中心,对功能起重要作用^[18]。在哺乳动物中,线粒体磷转运蛋白含有保守的 Cys42 残基,这个 Cys42 残基对 N-ethylmaleimide (NEM)敏感,对线粒体磷转运蛋白发挥正常功能有重要作用^[10],研究发现除了酵母以外,一些植物的线粒体磷转运蛋白相应位置也有这个保守的 Cys 残基^[7,17,18],水稻线粒体磷转运蛋白也含有保守的 Cys 残基(图3)。线粒体磷转运蛋白基因在植物体内如何发挥正常功能需进一步证明。

2.4 水稻 *OsMPT* 基因的基因组结构分析

用生物信息学的方法对水稻 *OsMPT* 基因的基因组结构进行了分析,发现其两个亚种的 *OsMPT* 基因组序列除极个别碱基外基本一致。粳稻中 *OsMPT* 基因定位于水稻 2 号染色体长臂上 138-140.9 cM 区间的序列号为 AP005287 的 BAC 克隆上,进一步比较 cDNA 和基因组序列的结果表明此 cDNA 区段所对应的基因组跨度为 3 453 bp,有 6 个外显子和 5 个内含子,所有内含子和外显子交接区都符合 GT-AG 规则(表 1)。内含子平均长度为 467 bp,平均 GC 含量为 35.5%,外显子平均长度为 186.3 bp,平均 GC 含量高于内含子为 54.0%。这与 TIGR 网站上关于水稻基因的统计数据一致。

2.5 水稻 *OsMPT* 基因的表达模式

在玉米和大豆中,线粒体磷转运蛋白基因在细胞分裂频繁的幼嫩组织如根尖、芽点、分生组织中表达丰富^[7]。虽然水稻线粒体磷转运蛋白基因在 1999 年就被克隆,但是它的表达模式还不清楚,它在亚种间是否有表达差异值得研究。应用两步法

表 1 水稻线粒体磷酸转运蛋白基因外显子和内含子交接区核苷酸序列分析

Table 1 Nucleotide sequence analysis of exon-intron junctions of rice mitochondrial phosphate transporter gene

外显子 Exon	GC含量 %	长度 Length	剪接供体位点 Splice donor site	内含子 Intron	GC含量 %	长度 Length	剪接受体位点 Splice acceptor site
1	70.7	294	CAACATGCAGgtgagttggg	1	40.5	808	ttttttcagATfGATCCAG
2	49.2	362	GCGCTCTTGgtaagtatna	2	32.0	100	ataatgcagGCTTACAAG
3	50.0	44	CAAAfCCCTTgtaagtatta	3	33.3	856	tcgtgtccagATACTATGAT
4	46.0	215	AGTGGGTGATgtaagcatgt	4	33.0	475	attataccagGCTGTAAAA
5	42.4	125	TGGTfGGACTgtaagatattc	5	29.2	96	attattcagfCCAACAACCC
6	56.4	78	TTGATfTCTATGCAGA				

内含子用小写字母表示,外显子用大写字母表示, Intron sequence is shown in small letters and exon sequence in capital letters.

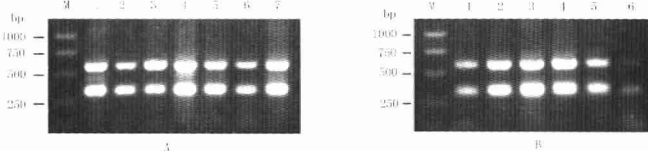


图 5 RT-PCR 分析水稻线粒体磷酸转运蛋白基因的表达

Fig. 5 RT-PCR expression analysis of *OsMPT* transcripts

A: 1-7 为水稻叶片: 1.秀颀; 2.丰锦; 3.珍珠苗; 4.广超丝苗; 5.中花 11; 6. Cpslo17; 7.丰粒占。1 到 7 are leaves of different rice cultivars. 1. Yuechang; 2. Fengjin; 3. Zhenjinzhao; 4. Guangchaosimiao; 5. Zhonghua 11; 6. Cpslo17; 7. Fengsizhan; M: DL2000 DNA marker. B: Cpslo17 器官: 1. 叶片; 2. 茎; 3. 幼穗; 4. 开花期花序; 5. 未成熟种子; 6. 愈伤。Different tissues of Cpslo17: 1. Young leaf; 2. Stem; 3. Young panicle; 4. Panicle at flowering stage; 5. Immature seed; 6. Callus.

RT-PCR 对其表达模式进行研究, 如图 5 所示, *OsMPT* 基因扩增产物大小为 600 bp, 同时扩增的 *actin* 基因产物大小为 335 bp, 结果表明 *OsMPT* 基因在水稻两个亚种粳稻和籼稻的 7 个品种的叶片中均有表达, 表达量与看家基因 *actin* 相当, 在 Cpslo17 营养器官叶片和茎及生殖器官短穗、开花期花序和未成熟种子中都有高水平表达。同时, 在处于未分化状态的愈伤中也有表达, 但表达量不高。这些提示水稻线粒体磷酸转运蛋白基因为组成型表达, 它可能在植物的生长、发育中起着重要作用。

内参基因和目的基因的 RT-PCR 反应可以在两管相同的体系中进行, 也可以在同一管中进行。影响 RT-PCR 反应的因素有 RNA 的高级结构、G+C 含量、引物 Tm 值、反应体系和反应条件等。本实验中 RT-PCR 反应在一管中, 即内参基因和目的基因在一个体系中扩增, 这样更严格, 可以提高结果的可信度, 并具有消除取样和点样误差的优点, 但是也有不足之处, 如引物之间的干扰作用, 模板、dNTP 的竞争作用, Tm 值的差异等。用降落 PCR (Touch down PCR) 扩增程序可以提高扩增产物的特

异性。如果在一管中 RT-PCR 反应因相互影响效果不好, 可以在两管中进行, 这样没有相互的干扰竞争, 且退火温度可以不同。实际进行 RT-PCR 反应时应该考虑各种因素, 摸索不同条件根据具体情况而定。

参考文献

- [1] Hanson M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility [J]. *Annu Rev Genet*, 1991, 25:461-486.
- [2] Akagi H, Sakamoto M, Shinjo C, et al. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility [J]. *Curr Genet*, 1994, 25:52-58.
- [3] Akagi H, Nakamura A, Sawada R, et al. Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile cybrid plants of rice [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90:948-951.
- [4] Phelps A, Briggs C, Mincone L, et al. Mitochondrial phosphate transport protein. Replacements of glutamic, aspartic, and histidine residues affect transport and protein conformation and point to a coupled proton transport path [J]. *Biochemistry*, 1996, 35:19757-19762.
- [5] Schroers A, Krämer R, Wohlrab H. The reversible antiport-uniport conversion of the phosphate carrier from yeast mitochondria depends on the presence of a single cysteine [J]. *J Biol Chem*,

- 1997, 272:10558-10564.
- [6] Ikehashi H, Araki H. Genetics of F₁ sterility in remote crosses of rice [A]. In: Rice Genetics [C]. Manila: IRRI, 1986. 119-130.
- [7] Takabatake R, Hata S, Taniguchi M, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice, and *Arabidopsis* [J]. Plant Mol Biol, 1999, 40:479-486.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucl Acids Res, 1997, 25:3389-3402.
- [10] Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool [J]. Appl Bioinform, 2002, 1:107-108.
- [11] Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, et al. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals [J]. Bioinformatics, 2002, 18:298-305.
- [12] Kyte J, Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157: 105-132.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucl Acids Res, 1997, 24:4876-4882.
- [14] Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, et al. Collection, mapping, and annotation of over 28 000 cDNA clones from *japonica* rice [J]. Science, 2003, 301:376-379.
- [15] Kuan J, Saier M H J. The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993, 28:209-233.
- [16] Runswick M J, Powell S J, Nyren P, et al. Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein [J]. EMBO J, 1987, 6:1367-1373.
- [17] Kiiskinen M, Korhonen M, Kangasjarvi J. Isolation and characterization of cDNA for a plant mitochondrial phosphate translocator (Mpt1): ozone stress induces Mpt1 mRNA accumulation in birch (*Betula pendula* Roth) [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35:271-279.
- [18] Nakamori K, Takabatake R, Umehara Y, et al. Cloning, Functional Expression, and Mutational Analysis of a cDNA for *Lotus japonicus* Mitochondrial Phosphate Transporter [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43:1250-1253.
- [19] Heijne G von, Steppuhn J, Herrmann R G. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides [J]. Europ J Biochem, 1989, 180:535-545.