

水稻CPR5基因参与氧化胁迫响应

刘锋¹, 舒曦¹, 郑艳华¹, 黎梓君², 阳成伟², 王亚琴^{1,2*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631)

摘要: 为探讨水稻(*Oryza sativa* L.)中 *CPR5* 基因的功能, 以其 cDNA 文库为基础进行序列比对, 并将 1 个同源性较高的序列命名为 *OsCPR5*。生物信息学分析表明, *OsCPR5* 的开放阅读框长度为 1551 bp, 编码 516 个氨基酸。软件预测该编码蛋白可能是 1 个具有 5 个跨膜区的膜蛋白和核定位蛋白。组织表达和亚细胞定位分析表明, *OsCPR5* 在根中的表达水平较高, 且广泛分布在细胞膜、细胞质和细胞核上。逆境胁迫分析实验表明, 植物激素脱落酸(Abscisic acid, ABA)、过氧化氢(Hydrogen peroxide, H₂O₂)、氯化钠(NaCl)、甲基紫精(Methyl viologen, MV)等环境胁迫可诱导 *OsCPR5* 的上调表达, 其中氧化胁迫相关的 MV 和 H₂O₂ 处理效果最为明显。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)转基因株系 *atcpr5/OsCPR5* 在浓度为 0.5 μmol L⁻¹、1.0 μmol L⁻¹ 的 MV 以及 6 mmol L⁻¹、8 mmol L⁻¹ 的 H₂O₂ 处理下, 种子萌发率明显高于 *atcpr5* 突变体。这揭示了 *OsCPR5* 基因在植物抗氧化胁迫响应中具有一定的作用。

关键词: 水稻; *OsCPR5*; 甲基紫精; 过氧化氢; 氧化胁迫

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.04.003

Involvement of Rice *CPR5* in Response to Oxidative Stress

LIU Feng¹, SHU Xi¹, ZHENG Yan-hua¹, LI Zi-jun², YANG Cheng-wei², WANG Ya-qin^{1,2*}

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: In order to understand the function of *CPR5* in rice (*Oryza sativa* L.), a homologous sequence, named as *OsCPR5*, was cloned from rice full-length cDNA library by BLAST. Bioinformatics analysis showed that the length of ORF in *OsCPR5* was 1551 bp, encoding 516 amino acids. The *OsCPR5* protein contained five transmembrane regions at the carboxy terminus, which also existed in *AtCPR5*. The expression of *OsCPR5* was high in roots. The subcellular localization showed that *OsCPR5* distributed widely in cell membrane, cytoplasm, and nucleus. The expression of *OsCPR5* in rice was up-regulated by different environment stresses, including exogenous abscisic acid (ABA), NaCl, especially methyl viologen (MV) and hydrogen peroxide (H₂O₂). When transgenic lines *atcpr5/OsCPR5* of *Arabidopsis thaliana* were treated with methyl viologen (0.5 μmol L⁻¹, 1.0 μmol L⁻¹) and hydrogen peroxide (6 mmol L⁻¹, 8 mmol L⁻¹), the seed germination rates were higher than that of *atcpr5* mutant. Therefore, it was suggested that *OsCPR5* played a role in response to oxidative stress.

Key words: Rice; *OsCPR5*; Methyl viologen; Hydrogen peroxide; Oxidative stress

植物在生长发育过程中通常会遭到各种非生物逆境胁迫因子, 如高温、低温、干旱、重金属、盐碱

等的影响。在这些胁迫条件下, 植物表现出生长发育迟缓, 严重时可导致作物产量降低和品质下降,

收稿日期: 2013-01-05 接受日期: 2013-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970216); 广东省自然科学基金项目(S2011010003358); 广东省科技计划项目(2007A020100001)资助

作者简介: 刘锋(1988~), 女, 硕士, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: liufeng_csd@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yqwang@scut.edu.cn

甚至引起死亡。例如,氧化胁迫(Oxidative stress)^[1]作为逆境应答中的一种普遍现象,会导致活性氧(Reactive oxygen species, ROS)产生。当环境胁迫长期作用于植株,产生的活性氧超出活性氧清除系统的能力时,就会产生氧化损伤^[2-3]。一直以来,研究作物对逆境胁迫响应的机制,发掘作物中能够抗逆境胁迫的基因,培育具有良好抗逆特性的农作物品种,成为国内外科研工作者关注的焦点问题。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中组成性表达相关发病机理基因 *CPR5* (Constitutive expression of pathogenesis-related genes 5)是一个多效性基因,最早发现其对梨枯病原体 and 寄生性病原菌卵菌产生组成性的抗病性^[4-5]。随后的研究表明,拟南芥 *CPR5* 在细胞增殖、细胞衰老、细胞死亡、蔗糖的感受、脱落酸途径、膜蛋白的编辑、细胞壁形成等方面都发挥着极其重要的作用^[5-9]。Clarke 等^[10-11]报道 *AtCPR5* 可通过依赖水杨酸和茉莉酸途径来调控基础耐热性。而 Wang 等^[12]认为在长期的热胁迫条件下, *AtCPR5* 通过调控热激蛋白和热激转录因子的表达来间接提高拟南芥的耐热能力。还有研究报道指出, *AtCPR5* 是一种新型的调控因子,可参与调节种子萌发、幼苗发育^[13]以及植物活性氧 ROS 信号途径^[4,14]。甲基紫精(MV)是除草剂百草枯的有效成分,可作为内源诱导物^[15]来诱导细胞内出现氧化逆境;过氧化氢(H₂O₂)在调节植物活性氧 ROS 过程中作为第二信使^[16]参与植物机械伤害和其他多种胁迫应答。

迄今为止,国内外对于拟南芥 *CPR5* 的生理功能已经进行了广泛的研究,而水稻中 *CPR5* 功能的报道尚属空白。因此,本文首次克隆了水稻 *CPR5* 同源基因(命名为 *OsCPR5*),对其生物信息学、组织表达特异性、亚细胞定位及各种非生物胁迫响应进行了研究,探讨该基因的序列特征及在逆境条件下的表达特性,为深入研究水稻抵御逆境胁迫的作用机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

水稻(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*)品种‘中花 11’种子、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(Columbia 生态型)、突变体 *atcpr5*、植物双元表达载体 pCanG、荧光表达载体 pBEGFP、大肠杆菌(*Escherichia*

coli) DH5 α 菌株、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 均由华南师范大学阳成伟实验室惠赠。

将水稻种子用手剥去掉颖壳,先用 70% 乙醇表面消毒 1 min,用无菌水清洗 3 次,再用 0.1% 的升汞杀菌消毒 15 min,期间时常振荡,然后用无菌水冲洗 5 次,转移到无菌滤纸上吸干表面的水分,均匀接种在 MS 固体培养基表面,用封口膜封好后,将其置于光强 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光周期为 16 h / 8 h (光 / 暗),温度为 28 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 80% 左右的培养室中培养。培养 14 d 左右,将一部分水稻幼苗从培养基中移出,洗净根部(注意避免对其造成机械损害),用吸水纸吸干水分,取少许幼苗用锡箔纸包裹好于液氮中速冻作为对照,其余进行相关胁迫处理。非生物胁迫处理如下:盐胁迫处理是将洗净水稻的根部于 200 mmol L^{-1} NaCl 溶液中,分别处理 2、4、6、24 h 后取样;热处理是将生长在培养基上的水稻幼苗,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱,分别处理 1、2、6、12、24 h 后取样;冷处理是将生长在培养基上的水稻幼苗,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,分别处理 2、4、6、12、24 h 后取样;ABA 处理是将洗净的水稻根部置于 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ABA 溶液中,分别处理 1、2、6、12、24 h 后取样;聚乙二醇(PEG)处理则是洗净的水稻根部置于 20% PEG6000 溶液中,分别处理 1、2、6、24 h 后取样;H₂O₂ 处理是将洗净的水稻根部置于 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H₂O₂ 溶液中,分别处理 2、4、6、24 h 后取样;MV 处理则是洗净的水稻根部置于 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MV 溶液中,分别处理 6、12、24 h 后取样。每次胁迫处理后的材料用锡箔纸迅速包好置液氮中速冻, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

实验中用到的质粒小量提取试剂盒(Plasmid Miniprep Kit)、琼脂糖凝胶回收试剂盒(Gel/PCR extraction Kit)购自 BioMIGA 公司。RNA 提取试剂盒(Trizol)购自 TaKaRa 公司。其它各种试剂购自 SIGMA、生工生物工程(上海)有限公司和广州化学试剂厂等生物公司的分析纯试剂。

1.2 逆转录-PCR反应

按照 Trizol 试剂盒说明书提取上述胁迫处理水稻的总 RNA,取 2 μg 总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成(具体方法参见 TaKaRa 相关试剂盒说明书),然后以该逆转录产物作为模板扩增 *OsCPR5* 基因。扩增 *OsCPR5* 片段的引物为 *OsCPR5*-F:

5'-TAACGCATCTTCGGCATAGC-3'; *OsCPR5*-R: 5'-ACTGAATTTGGCATCCACCA-3'。内参基因引物 *OsActin*-F: 5'-GGAAGTGGTATGGTCAAGGCT-3'; *OsActin*-R: 5'-ACACGGAGCTCGTTGTAGA-AG-3'。扩增 *OsActin* 的 PCR 程序为: 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增 *OsCPR5* 的程序为: 95℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 29 ~ 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。在严格保证样品处理、总 RNA 提取、反转录、PCR 等过程中各条件和参数一致的情况下进行 3 次重复实验。

1.3 表达载体的构建

按照 *OsCPR5* 基因序列设计含有 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切位点的引物, *OsCPR5*-pCanG-F: 5'-TTGGTACCATGTCCTTCGCCGCCGT-3'; *OsCPR5*-pCanG-R: 5'-GGATCCTCATGCTTCAATCTTGTCAC-3'。*OsCPR5*-pBEGFP-F: 5'-GGTACCTATGTCC-TTCGCCGCCGT-3'; *OsCPR5*-pBEGFP-R: 5'-GGA-TCCACTGCTTCAATCTTGTCACCGA-3'。提取野生型水稻幼苗总 RNA, 通过 KOD 高保真酶(ToYoBo) 和对应的引物对 *OsCPR5* 基因片段进行 PCR 扩增, 连接 pMD18-T Vector 并转化大肠杆菌, 筛选出阳性克隆提取质粒, 经 PCR 和酶切验证后送华大基因有限公司测序验证。然后, 将测序正确的片段分别与 pCanG 和 pBEGFP 载体连接转化, 从而构建出 *OsCPR5*-pCanG 和 *OsCPR5*-pBEGFP 表达载体。

1.4 生物信息学分析

从拟南芥 TAIR 数据库(The *Arabidopsis* Information Resource)中找到 AtCPR5 的氨基酸序列, 然后在水稻数据库(Rice Genome Annotation Project)中通过 BlastP 来寻找其同源序列。借助 ExPASy 数据库中的 ProtParam 在线工具(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)对蛋白序列进行基本理化性质分析。The Predict Protein server (<http://www.Predictprotein.org/>)^[17]对潜在的核定位信号进行分析。利用工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)^[18]分析蛋白质的跨膜结构域。在 NCBI 数据库中搜索与 *OsCPR5* 蛋白同源的其他植物序列, 借助 MEGA 5.0^[19]软件, 采用 Neighbor-joining (NJ) 方法来构建系统发育树^[20], 其中 Bootstrap 分析重复数

为 1000。蛋白质的亚细胞定位分析软件为 WOLF PSORT (<http://wolfsort.org/>)和 SubLoc v1.0 (http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm)。

1.5 拟南芥的遗传转化及转基因植株的鉴定

参照 Fillatti 等^[21]的方法, 将构建的重组质粒 *OsCPR5*-pCanG 通过冻融法导入农杆菌 EHA105 中备用。拟南芥种子用 75% 乙醇消毒 1 min, 再用 2% 的次氯酸钠灭菌处理 3 ~ 5 min, 期间不断振荡, 然后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次, 均匀接种在 MS 固体培养基(MS 大量元素、有机物质、铁盐、微量元素相同, 添加 0.8% 琼脂(W/V)和 1.5% 蔗糖, 用 1 mol L⁻¹ NaOH 溶液调至 pH 为 5.7 ~ 5.8)上, 在 4℃ 冰箱中春化 2 ~ 3 d。之后将其置于光强 100 μmol m⁻²s⁻¹, 光周期为 16 h / 8 h (光 / 暗), 温度为 22℃ ~ 24℃, 相对湿度为 80% 左右的培养室中培养。培养 7 d 左右, 将幼苗转移到混合营养土中培养至长出花苞, 转化前需将已授粉的花和果荚剪掉。然后将之前保存的 *OsCPR5*-pCanG 农杆菌, 接种到含有 75 mg L⁻¹ 卡那霉素(Kan)和 60 mg L⁻¹ 利福平(Rif)的 5 mL LB 液体培养基中(胰蛋白胨 10 g L⁻¹ + NaCl 10 g L⁻¹ + 酵母提取物 5 g L⁻¹), 在 28℃ 下以 200 r min⁻¹ 摇菌培养过夜(12 ~ 16 h)收集菌体, 参照 Clough 和 Bent 等^[22]的方法, 采用花序浸染法进行拟南芥 *atcpr5* 突变体的转化, 转化植株在含有 50 mg L⁻¹ Kan 的平板上筛选并进行 RT-PCR 检测, 选取单拷贝插入的纯合转基因株系用于后续实验。PCR 检测目的基因 *OsCPR5* 的引物为 *OsCPR5*-F: 5'-TTGGTACCATGTCCTTCGCCGCCGT-3'; *OsCPR5*-R: 5'-GGATCCTCATGCTTCAATCTTGTCAC-3', 内参基因 *AtActin* 的引物为 *AtActin*-F: 5'-CTACGAGCAGGAAGTTCGAGA-3'; *AtActin*-R: 5'-GATGGACCTGACTCGTCATAC-3'。扩增 *AtActin* 的程序为: 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增 *OsCPR5* 的程序为: 95℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.6 亚细胞定位

参照 Horsch 等^[23]的方法, 略有改进。野生型烟草(*Nicotiana tabacum*)种子消毒灭菌后, 接种于

1/2 MS 固体培养基上,在 4℃ 冰箱中春化 2~3 d,然后置于 22℃~23℃、16 h/8 h (光照/黑暗)的培养室中生长 4~6 周,直至长成健壮的成苗,将烟草无菌苗的叶片切成小方块(大小约 0.5 cm × 0.5 cm)作为转化的起始外植体材料。把携带有 *OsCPR5*-pBEGFP 的根癌农杆菌,在含有 60 mg L⁻¹ 利福平和 75 mg L⁻¹ 卡那霉素的 YEB (胰蛋白胨 5 g L⁻¹ + 酵母提取物 1 g L⁻¹ + 牛肉浸膏 5 g L⁻¹ + MgSO₄·7H₂O 0.493 g L⁻¹ + 琼脂粉 15 g L⁻¹,调节 pH 至 7.0~7.2) 平板上划线,置 28℃ 恒温培养箱培养约 2 d,挑取单菌落于 20 mL 含相应抗生素的 YEB 液体培养液中,于 28℃ 下以 200 r min⁻¹ 振荡培养 36 h。按 1% 接种量再接种于含相同抗生素的 YEB 液体培养基中,于 28℃ 下以 250 r min⁻¹ 振荡培养 6 h,至 OD₆₀₀ 值为 0.8~1.0。取 1 mL 菌液用 MS 培养液稀释至 OD₆₀₀ = 0.2,用于侵染烟草叶片。将剪切好的烟草叶盘置于菌悬液中轻微振荡 10 min 后,在无菌的滤纸上吸干菌液,转移到 SIM 培养基(MS 培养基 + 1 mg L⁻¹ 6-苜氨基腺嘌呤 + 0.1 mg L⁻¹ α-萘乙酸,用 1 mol L⁻¹ NaOH 溶液调至 pH 为 5.7~5.8)上,28℃ 暗培养 2 d。外植体用灭菌的 MS 液体培养基洗 3~5 次,然后用无菌的滤纸吸干水分,转移到含 100 mg L⁻¹ 卡那霉素和 250 mg L⁻¹ 的羧苄青霉素(Cd)的 SIM 上培养。每两个星期换 1 次 SIM 培养基,直到长出小芽。切取带少量愈伤组织的小芽于 1/2 MS 固体培养基上生根成苗,然后转移至混合营养土中栽培,获得转基因烟草植株。然后利用 Zeiss LSM 710 激光共聚焦显微镜来观察烟草根尖细胞中目的基因的表达情况,以未转基因的野生型植株作对照。GFP 的激发波长是 488 nm,发射波长是 508~530 nm。

1.7 甲基紫精和过氧化氢处理

配制含不同浓度梯度 MV、H₂O₂ 的 MS 固体培养基,将灭菌后的野生型 WT, *atcpr5*, *atcpr5/OsCPR5*(两个株系 HB3、HB4)的拟南芥同批种子均匀铺到相应的培养基上,用于观察种子萌发情况。种子萌发以胚根突破种皮作为标准。所得实验数据用 Excel 统计,并用 SigmaPlot 12.0 作图。采用 One-Way 方差分析和最小显著差异法(LSD)来比较不同处理间的差异显著性。3 次独立的重复试验, $P < 0.05$ 表示差异达到显著水平。

2 结果和分析

2.1 *OsCPR5*的分子特征

OsCPR5 基因编号为 Os01g68970,其开放阅读框长 1551 bp,编码 516 个氨基酸,OS CPR5 分子量为 57.01 KD,等电点 PI 为 8.93。*OsCPR5* 含有 5 个外显子和 4 个内含子,不存在标记的功能区域,其中内含子相位均为 0,处在两个完整的密码子之间(图 1: A)。

已知 AtCPR5 蛋白是 1 个膜蛋白,在第 4 个外显子上含有 5 个跨膜区域。该蛋白 N 端含有核定位信号(NLS),位于第 40~56 位氨基酸(KKKKDTNPSNLEKRKL)^[6]。用 TMHMM 软件预测显示,水稻 CPR5 蛋白没有已知的功能结构域,但是存在与 AtCPR5 蛋白结构类似的 5 个跨膜区域(图 1: B)。采用 The Predict Protein server^[17]预测核定位信号,表明 *OsCPR5* 蛋白在第 51~58 位也同样存在核定位信号(LRRRGRQ)。表明 *OsCPR5* 可能是 1 个膜蛋白和核定位蛋白。

2.2 *OsCPR5*的氨基酸同源性分析

在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,结果表明,葡萄(*Vitis vinifera*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、玉米(*Zea mays*)等物种中存在与水稻 CPR5 同源的蛋白序列。本研究选取了同源性较近的 11 种植物的氨基酸序列来构建系统发育进化树(图 2)。这 11 种植物的 CPR5 可划分为二类:拟南芥、葡萄、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、大豆(*Glycine max*)、蓖麻、毛果杨(*Populus trichocarpa*)聚为一类,它们均为双子叶植物;二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、水稻聚为一类,它们都是单子叶植物,这与形态学上的分类是一致的。从图中还可以看出 *OsCPR5* 蛋白与 AtCPR5 的亲缘关系处在较近的分支上,推测 *OsCPR5* 可能在水稻生长发育过程中起重要作用。

2.3 *OsCPR5*的表达模式

基因的时空表达是其正常行使功能的基础与前提,分为组成型表达与组织特异型表达。为了研究 *OsCPR5* 基因的表达是否具有组织特异性,本文通过 RT-PCR 方法检测水稻植株不同组织器官中 *OsCPR5* 的表达情况。结果表明, *OsCPR5* 在老根

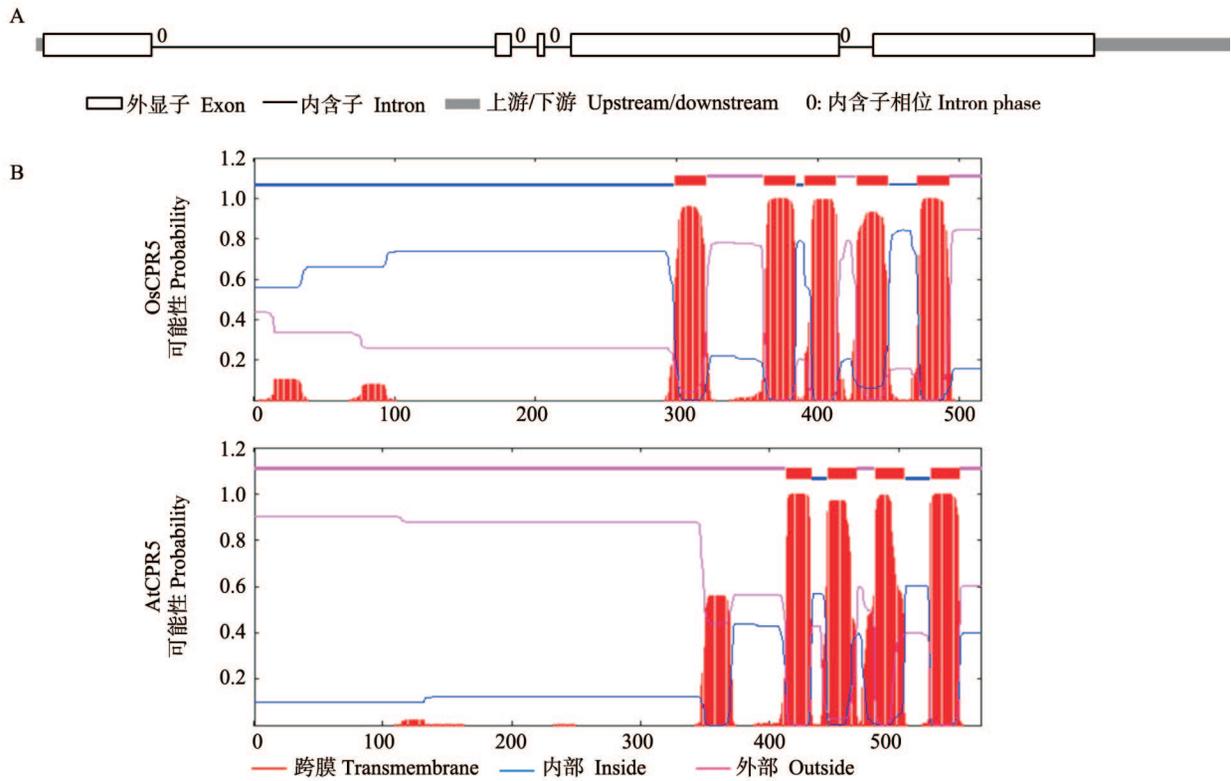


图 1 OsCPR5 蛋白的结构特征。A: *OsCPR5* 基因结构图; B: *OsCPR5* 蛋白的跨膜分析。

Fig. 1 Structure characteristic of *OsCPR5*. A: Genomic organization of *OsCPR5*; B: Transmembrane analysis for *OsCPR5*.

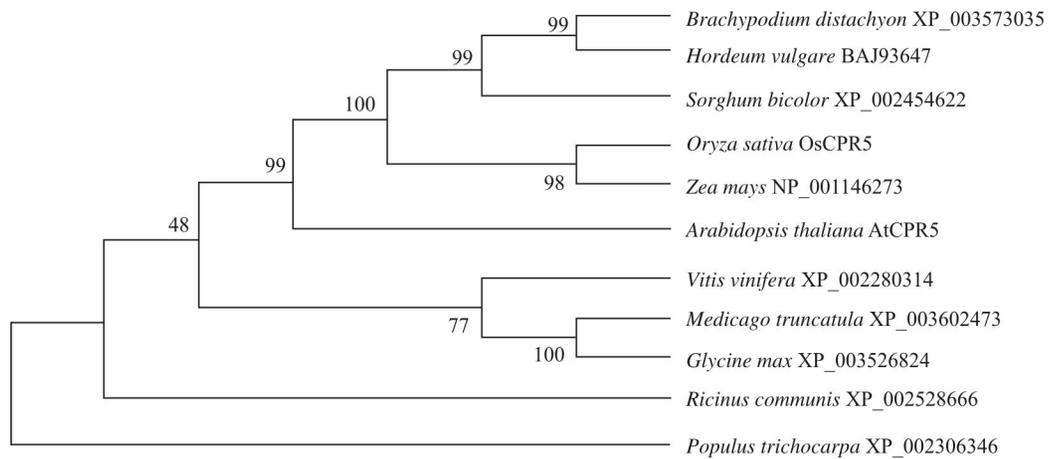


图 2 水稻 *OsCPR5* 与其他物种同源序列的进化树分析。XP_003573035: 二穗短柄草; BAJ93647: 大麦; XP_002454622: 高粱; NP_001146273: 玉米; XP_002280314: 葡萄; XP_003602473: 蒺藜苜蓿; XP_003526824: 大豆; XP_002528666: 蓖麻; XP_002306346: 毛果杨。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of rice *OsCPR5* and other species. XP_003573035: *Brachypodium distachyon*; BAJ93647: *Hordeum vulgare*; XP_002454622: *Sorghum bicolor*; NP_001146273: *Zea mays*; XP_002280314: *Vitis vinifera*; XP_003602473: *Medicago truncatula*; XP_003526824: *Glycine max*; XP_002528666: *Ricinus communis*; XP_002306346: *Populus trichocarpa*.

和幼根中的表达水平较高,在幼叶、旗叶、穗中的表达较弱,而在老茎和幼茎中几乎没有表达(图 3),说明 *OsCPR5* 的表达具有组织特异性,这为后续研究其功能提供了重要的线索。

2.4 *OsCPR5*的亚细胞定位

采用蛋白质分析软件 WoLF PSORT 和 SubLoc v1.0 对 *OsCPR5* 基因表达蛋白的定位方式进行预测,结果表明该蛋白可能定位在细胞核、叶绿体

类囊体膜或细胞质中。为了进一步确定 *OsCPR5* 蛋白在细胞中发挥功能的具体部位,本文构建了 p35S::*OsCPR5*-GFP 融合表达载体,通过叶盘转化法将其转入烟草中。分别选取野生型、p35S::*OsCPR5*-GFP 转基因烟草靠近根尖的部位,在共聚焦显微镜下进行观察(图 4)。结果表明,在野生型对照烟草的根尖细胞中没有绿色荧光,而转 p35S::*OsCPR5*-GFP 烟草的根尖细胞中,可以明显地观察到绿色荧光出现在细胞膜、质和细胞核中。初步确定 *OsCPR5* 定位于细胞核、细胞膜和细胞质中。

2.5 *OsCPR5* 基因在逆境胁迫下的表达分析

为了探讨 *OsCPR5* 基因如何响应逆境胁迫,首先对 *OsCPR5* 基因的启动子区域进行了预测分析,发现其启动子区域含有大量与植物激素以及非生物逆境胁迫相关的顺式作用元件。因此初步推测 *OsCPR5* 基因可能参与一些非生物胁迫的应答。因此,我们研究了 ABA、 H_2O_2 、PEG 等非生物胁迫因子对该基因的影响。结果表明,在 7 种胁迫处理下, *OsCPR5* 基因的表达模式存在一定的差异(图 5)。与对照相比,冷和热击处理下 *OsCPR5* 基因表达水平并未发生明显的变化(图 5: C,E),暗示

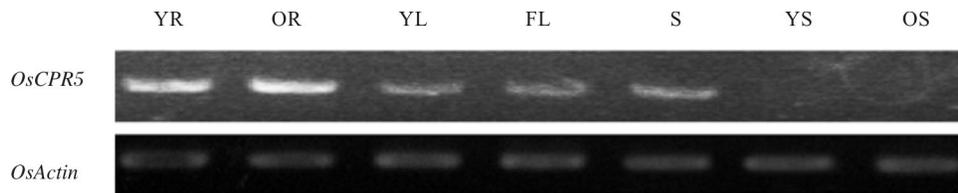


图 3 *OsCPR5* 在拟南芥不同组织中的表达。YR: 幼根; OR: 老根; YL: 幼叶; FL: 旗叶; S: 穗; YS: 幼茎; OS: 老茎。

Fig. 3 Expression of *OsCPR5* in different tissues of *Arabidopsis thaliana*. YR: Young root; OR: Old root; YL: Young leaf; FL: Flag leaf; S: Spikelet; YS: Young stem; OS: Old stem.

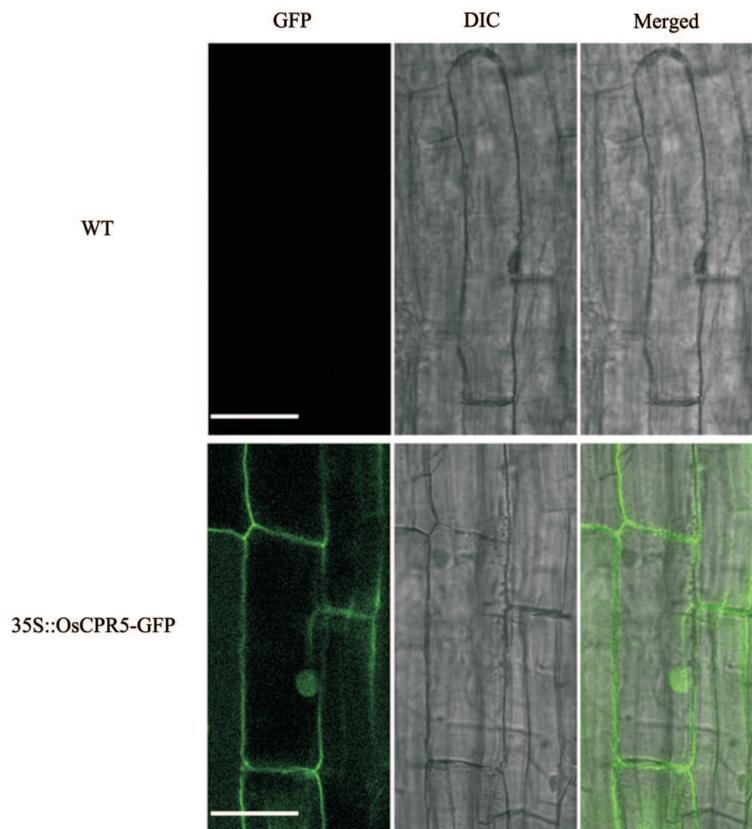


图 4 *OsCPR5* 在烟草细胞中的亚细胞定位。左: GFP 绿色荧光信号;中: DIC 白光信号;右: Merged GFP 信号叠加信号。标尺 = 50 μ m

Fig. 4 Subcellular localization of *OsCPR5* in tobacco cell. Left: GFP fluorescence image; Middle: Bright-field image; Right: Merged GFP fluorescence image. Scale bars = 50 μ m

OsCPR5 的表达可能不受冷和热处理的诱导;PEG 胁迫处理 6 h 以内, *OsCPR5* 的表达明显下调(图 5: D), 说明短时间内 PEG 胁迫可抑制 *OsCPR5* 基因的表达;而 ABA、NaCl、MV 和 H₂O₂ 处理可促进 *OsCPR5* 基因的表达(图 5: A,B,F,G), 尤其是 MV 和 H₂O₂ 对 *OsCPR5* 基因表达的促进作用最为明显。这些结果说明 *OsCPR5* 基因可能在氧化胁迫信号应答过程中发挥一定的作用。

2.6 *OsCPR5*提高转基因拟南芥对外源MV、H₂O₂的氧化胁迫响应

水稻作为单子叶植物研究的模式植物,其转化方法通常采用农杆菌介导的遗传转化体系,该方法虽然已经比较成熟,但是水稻从愈伤组织分化到出苗的周期相对较长且步骤繁琐。因此,本文先通过异源表达的方法,将 *OsCPR5* 转化拟南芥 *atcpr5* 突变体来探究 *OsCPR5* 在氧化胁迫响应方面的功能。本文采用花序浸染法(floral dipping)^[22]转化拟南芥,在含有 50 mg L⁻¹ 卡那霉素的平板上筛选获得 *atcpr5/OsCPR5* 转基因植株。RT-PCR 分析结果表明, *OsCPR5* 基因在野生型和 *atcpr5* 突变体对

照中没有表达,却在 *atcpr5/OsCPR5* 转基因植株中有较强的表达水平,说明该外源基因已经成功转入到拟南芥中,可用于后续的生理实验(图 6: A)。

将 WT、*atcpr5*、*atcpr5/OsCPR5* (HB3, HB4) 转基因拟南芥的同批种子播种于含有不同浓度 MV 和 H₂O₂ 的 MS 固体培养基上(对照组播种于不含 MV 和 H₂O₂ 的 MS 固体培养基上),统计 24 h 后的种子萌发率,分析不同转基因拟南芥种子对外源胁迫诱导剂 MV 和 H₂O₂ 的敏感性。结果表明,随着 MV 处理浓度的增加,拟南芥种子的萌发率均受到不同程度的影响,其中 *atcpr5* 的抑制作用尤为明显;在 0.5 μmol L⁻¹, 1.0 μmol L⁻¹ 的 MV 处理后, *atcpr5/OsCPR5* 的萌发率明显高于 *atcpr5*, 且差异达到显著水平($P < 0.05$)(图 6: B)。而不同基因型的转化植株经 H₂O₂ 处理后,结果表明, H₂O₂ 处理也会抑制拟南芥种子的萌发;在 4 mmol L⁻¹ H₂O₂ 处理下, 3 种转基因植株之间的萌发率并没有太大的差异,但是 6 mmol L⁻¹、8 mmol L⁻¹ H₂O₂ 处理下, *atcpr5/OsCPR5* 与 *atcpr5* 的萌发率却存在显著差异(图 6: C)。结果表明 *OsCPR5* 转基因植株在氧化胁迫下的抗性有所提高,揭示了 *OsCPR5* 基因可能在

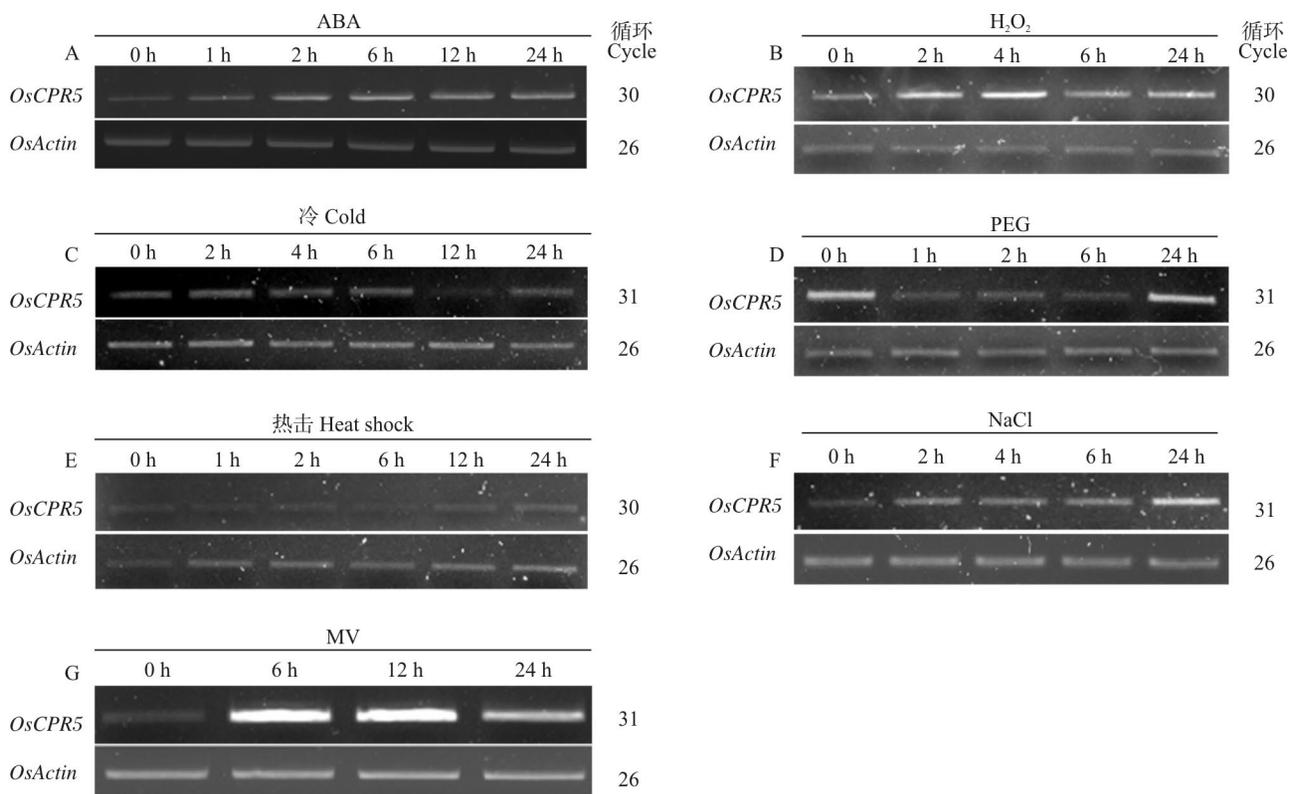


图 5 水稻 *OsCPR5* 在不同胁迫下的表达分析
Fig. 5 Expression of *OsCPR5* in rice under abiotic stresses

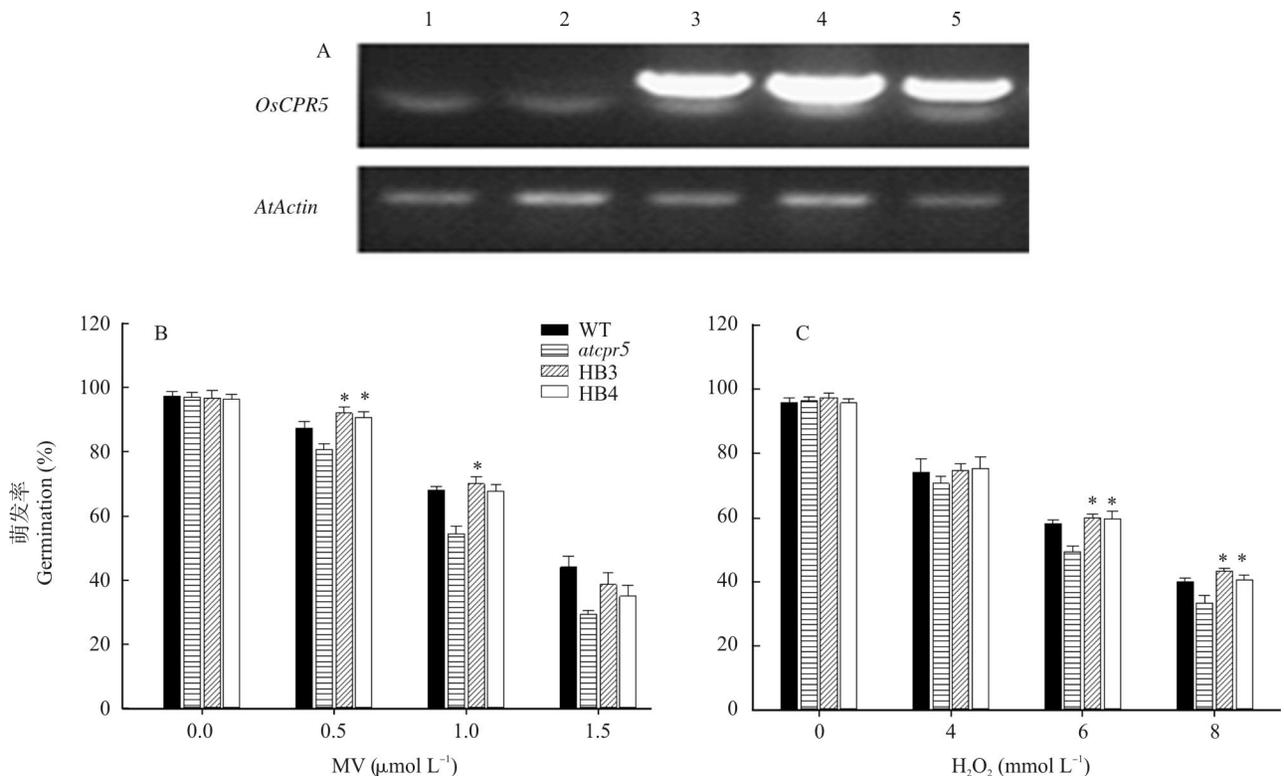


图6 WT、*atcpr5*、*atcpr5/OsCPR5* (HB3, HB4)基因型植株对MV和 H_2O_2 的响应。A: 转基因植株的RT-PCR鉴定。1: 野生型; 2: *atcpr5*突变体; 3~5: *atcpr5/OsCPR5* (HB3, HB4, HB5)植株; B: 不同基因型在含有0、0.5、1.0和1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MV的MS培养基上的萌发率; C: 不同基因型在含有0、4、6和8 mmol L^{-1} H_2O_2 的MS培养基上的萌发率。*: *atcpr5*与*atcpr5/OsCPR5*间的差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 6 Germination rates of WT, *atcpr5*, *atcpr5/OsCPR5* types under MV and H_2O_2 treatment. A: Identification of transgenic Arabidopsis lines. 1: Wild type; 2: *atcpr5* type; 3–5: *atcpr5/OsCPR5* type; B: Germination rates on MS medium containing 0, 0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MV, respectively; C: Germination rates on MS medium containing 0, 4, 6, 8 mmol L^{-1} H_2O_2 , respectively. *: Significant difference between *atcpr5* and *atcpr5/OsCPR5* at 0.05 level.

植物响应氧化胁迫过程中起一定的作用,这与前面RT-PCR初步分析结果(图5: B,G)基本一致。

3 讨论

植物在遭遇逆境胁迫时,通常会产出一系列的应答反应以减轻或消除胁迫对其造成的危害,植物的这种自我保护机制具有多基因、多信号途径与多基因产物的特点^[24]。水稻作为世界上最重要的粮食作物之一,是全球超过一半人口的主要食物和能量来源,同时也成为植物生长发育、逆境反应等基础研究的模式植物^[25]。各种生物和非生物胁迫是影响水稻生长和产量的重要因素,因此发掘水稻抗逆境胁迫的基因将为基因工程改良水稻新品种打下基础。

生物信息学分析在生物学研究中起着越来越重要的作用,是系统生物学发展的基础。通过生物

信息学手段可对基因的表达和功能、基因的启动子功能分析、基因对外界条件的响应以及氨基酸序列特征、蛋白结构功能特征等进行分析并获得庞大的数据资源,从而为研究不同物种中未知基因的功能提供线索。通过结构域预测发现, *OsCPR5*与*AtCPR5*之间均存在跨膜结构(图1: B)。Gao等^[13]构建PCanG-CPR5 Δ TM缺失最后3个跨膜区的表达载体,转化*atcpr5*突变体,得到转基因植株却不能互补其矮小、表皮毛分叉少的表型,证实了蛋白质的跨膜区是影响蛋白质功能的重要结构。因此,我们推测*OsCPR5*的跨膜结构也可能对其蛋白质功能的维持起作用。

蛋白质作为生命活动的主要承担者,其功能的研究已成为生物学研究中的一个热点话题。基因的组织特异性表达和蛋白质的亚细胞定位能为蛋白质功能研究提供重要的线索和依据。本文通过RT-PCR检测*OsCPR5*在水稻不同组织中的表

达水平,表明根中 *OsCPR5* 的表达水平较高,幼叶、旗叶、穗中也能检测到较弱的表达,而在茎中却几乎没有表达(图 3)。通过转基因烟草研究 *OsCPR5* 的亚细胞定位,结果表明 *OsCPR5* 广泛分布在细胞膜、细胞质和细胞核上,这与软件预测的结果一致,然而却与拟南芥 *CPR5* 蛋白的细胞质定位方式^[13]不一致。我们知道,不同物种间同源基因的亚细胞定位方式是可能存在差异的,如 Bousquet 等^[26]和 Cardazzo 等^[27]报道酵母 ABC1 在拟南芥中的同源蛋白 AtABC1 定位在线粒体;而 Wang 等^[28]观察到小麦 TaABC1 定位在细胞膜、细胞质和细胞核中。水稻和拟南芥同源蛋白 *CPR5* 亚细胞定位方式存在差异可能是这两个蛋白参与行使功能的方式不同所致。

课题组在研究拟南芥 *CPR5* 功能时,认为 *AtCPR5* 基因在植物 ABA、干旱胁迫信号传导以及耐热性方面具有重要的功能^[12-13]。本研究对 *OsCPR5* 的研究表明,在 MV 和 H₂O₂ 胁迫处理下, *OsCPR5* 在水稻中的转录水平明显上调,且 *OsCPR5* 转基因植株的萌发率明显高于 *atcpr5* 突变体(图 5, 6),表明 *OsCPR5* 可一定程度地提高植物对氧化胁迫的耐受能力。推测该基因可能通过体内的调控网络应答外界胁迫信号,从而抵御环境伤害。Jing 和 Dijkwel^[14]认为 *AtCPR5* 是作为细胞内 ROS 信号途径中的主要调节因子参与氧化胁迫的应答调控过程。虽然 *OsCPR5* 和 *AtCPR5* 在提高植物抗氧化胁迫方面都具有非常重要的功能,但是由于它们分别所属单子叶植物和双子叶植物,在整个生物进化过程中彼此之间也存在较大的差异,因此我们还需进一步研究才能明确 *OsCPR5* 参与调节氧化胁迫的作用机制。

参考文献

- [1] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trend Plant Sci*, 2002, 7(9): 405–410.
- [2] Du X M, Yin W X, Zhao Y X, et al. The production and scavenging of reactive oxygen species in plants [J]. *Chin J Biotechnol*, 2001, 17(2): 121–125.
杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中活性氧的产生及清除机制 [J]. *生物工程学报*, 2001, 17(2): 121–125.
- [3] Zhao L Y, Deng X P, Shan L. The response mechanism of active oxygen species removing system to drought stress [J]. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*, 2005, 25(2): 413–418.
赵丽英, 邓西平, 山仑. 活性氧清除系统对干旱胁迫的响应机制 [J]. *西北植物学报*, 2005, 25(2): 413–418.
- [4] Bowling S A, Clarke J D, Liu Y, et al. The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(9): 1573–1584.
- [5] Boch J, Verbsky M L, Robertson T L, et al. Analysis of resistance gene-mediated defense responses in *Arabidopsis thaliana* plants carrying a mutation in *CPR5* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11(12): 1196–1206.
- [6] Kirik V, Bouyer D, Schöbinger U, et al. *CPR5* is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(23): 1891–1895.
- [7] Jing H C, Anderson L, Sturre M J G, et al. *Arabidopsis CPR5* is a senescence-regulatory gene with pleiotropic functions as predicted by the evolutionary theory of senescence [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(14): 3885–3894.
- [8] Jing H C, Hebel R, Oeljeklaus S, et al. Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in *Arabidopsis cpr5/old1* mutants [J]. *Plant Biol*, 2008, 10(Suppl. 1): 85–98.
- [9] Brininstool G, Kasili R, Simmons L A, et al. Constitutive expressor of pathogenesis-related *Genes5* affects cell wall biogenesis and trichome development [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 58.
- [10] Clarke S M, Mur L A J, Wood J E, et al. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2004, 38(3): 432–447.
- [11] Clarke S M, Cristescu S M, Miersch O, et al. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytol*, 2009, 182(1): 175–187.
- [12] Wang Y Q, Ye Q H, Zhang M Y, et al. Involvement of *Arabidopsis CPR5* in thermotolerance [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34(6): 2093–2103.
- [13] Gao G L, Zhang S C, Wang C F, et al. *Arabidopsis CPR5* independently regulates seed germination and postgermination arrest of development through LOX pathway and ABA signaling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19406.
- [14] Jing H C, Dijkwel P P. *CPR5*, A Jack of all trades in plants [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3(8): 562–563.
- [15] Babbs C F, Pham J A, Coolbaugh R C. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90(4): 1267–1270.
- [16] Orozco-Cárdenas M L, Narváez-Vásquez J, Ryan C A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(1): 179–191.
- [17] Nair R, Carter P, Rost B. NLSdb: database of nuclear localization signals [J]. *Nucl Acid Res*, 2003, 31(1): 397–399.
- [18] Krogh A, Larsson B È, Von Heijne G, et al. Predicting

- transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes [J]. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 567–580.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [20] Wang L J, Tian Y C, He C Z. Cloning of a novel rice gene *OsLSD1* and bioinformatic analysis of LSD1-like gene family from *Arabidopsis* and rice [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(3): 268–274.
王丽娟, 田颖川, 何朝族. 新基因水稻*OsLSD1*的克隆及拟南芥和水稻类*LSD1*基因家族的生物信息学分析 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(3): 268–274.
- [21] Fillatti J J, Kiser J, Rose R, et al. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector [J]. *Nat Biotechnol*, 1987, 5(7): 726–730.
- [22] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743.
- [23] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229–1231.
- [24] Xu Z S, Chen M, Li L C, et al. Functions of the *ERF* transcription factor family in plants [J]. *Botany*, 2008, 86(9): 969–977.
- [25] Voisenek L A C J, Bailey-Serres J. Plant biology: Genetics of high-rise rice [J]. *Nature*, 2009, 460(7258): 959–960.
- [26] Bousquet I, Dujardin G, Slonimski P P. *ABCI*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: It suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc1 complex [J]. *EMBO J*, 1991, 10(8): 2023–2031.
- [27] Cardazzo B, Hamel P, Sakamoto W, et al. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA by complementation of a yeast *abc1* deletion mutant deficient in complex III respiratory activity [J]. *Gene*, 1998, 221(1): 117–125.
- [28] Wang C X, Jing R L, Mao X G, et al. *TaABCI*, a member of the activity of bc1 complex protein kinase family from common wheat, confers enhanced tolerance to abiotic stresses in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(3): 1299–1311.