

## 水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆 及其 mRNA 在水稻中的组成型表达

鄂超苏 田颖川 王群 莽克强

(中国科学院微生物研究所中国科学院北京植物生物工程实验室 北京 100080)

从 40 年代发现豆科植物中存在蛋白酶蛋白抑制剂以来<sup>(1)</sup>, 在动物、植物和微生物体内已发现普遍存在着多种类型的蛋白酶抑制剂 (PI)。人们往往是为了研究某种蛋白酶的作用机制或出于某种应用目的去分离和研究 PI 的, 对 PI 的真正生理功能尚不十分清楚。一般认为除防止体内不必要的蛋白降解作用、调节蛋白代谢及调节各种蛋白酶的生理活性外, 很多植物的 PI 还具有抑制某些病原微生物及某些昆虫体内蛋白酶的作用, 从而对植物有防卫功能<sup>(2)</sup>。Hilder 等<sup>(3)</sup>和 Johnson 等<sup>(4)</sup>已分别将属于丝氨酸蛋白酶抑制剂的豇豆蛋白酶抑制剂及马铃薯 PII 和 PIII 基因转入烟草, 结果转基因烟草对烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 和烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 有毒杀和抑制生长的作用。已有报道表明有些半胱氨酸蛋白酶抑制剂对鞘翅目及半翅目昆虫的消化酶有抑制作用<sup>(5)</sup>。Masoud 等<sup>(6)</sup>已将水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因转入了烟草但未报道转基因烟草是否获得了抗虫活性。研究这类蛋白酶抑制剂在植物体内的表达特点将有助于了解其生理功能及更有效地利用这类基因进行植物抗病抗虫基因工程的研究。本文报道我们用 PCR 技术对水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 (OC-1) 的克隆及利用克隆的 OC-1 基因作探针研究该基因在水稻发育不同时期在 mRNA 水平上表达的初步研究结果。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 植物材料

实验选用的水稻为生产品种矮脚南特。

#### 1.2 菌种和质粒

克隆载体为 Stratagene 公司的 pBluescript SK<sup>+</sup>, 所用菌种为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。

#### 1.3 生化试剂

实验用的限制酶购自 Boehringer 或 Promega 公司; cDNA 合成试剂盒为 Boehringer 公司产品; Taq DNA 聚合酶购自 Perkin Elmer 公司;  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自 NEN 公司; DNA 序列分析采用 Pharmacia 公司的 T7 DNA Sequencing Kit; PCR 引物由本所技术室合成。

#### 1.4 RNA 的提取

用热酚法<sup>(7)</sup>提取水稻总 RNA。

#### 1.5 cDNA 合成

取从孕穗期稻穗中提取的总 RNA 5 $\mu$ g, 以 Oligo dT 为引物按说明书方法合成 ss-cDNA。

#### 1.6 OC-1 基因的 PCR 扩增

参照 Abe 等<sup>(8)</sup>人发表的 OC-1 基因序列设计了以下引物进行 PCR 扩增: 5' 端引物为 5' AGGATC-CAACAAATGTCGAGCGACGGA; 3' 端引物为 5' ACTCGAGCCTTAGGCATTTCG。以 4 $\mu$ l 合成的 ss-cDNA 为模板, 在 50 $\mu$ l PCR 反应体系中加入以上引物各 50pmol; dNTP 最终浓度为 200 $\mu$ mol/L; Taq DNA 聚合酶 5u; PCR 采用厂家提供的缓冲液。首先以 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 然后以 94 $^{\circ}$ C, 1min, 58 $^{\circ}$ C, 1min,

该项研究由国家“863”计划资助并得到国际科学文化中心 (ICSC) 世界试验室 [瑞士, 洛桑] 的部分资助。  
本文于 1994 年 9 月 13 日收到。

72℃, 1min, 共进行 30 个循环。取反应混和物 5 $\mu$ l 进行电泳检查。

### 1.7 OC-1 基因克隆的筛选

以上 PCR 产物经酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 20 $\mu$ l 无离子水中, 取 7 $\mu$ l 在 15 $\mu$ l 连接反应体系中与 50ng EcoRV 酶切后的 pBluescript SK<sup>+</sup> 15℃ 连接过夜。连接反应混合物对感受态 DH5 $\alpha$  细胞的转化、质粒的提取及酶切分析按文献 [9] 进行。

### 1.8 DNA 序列分析

用 T7 和 T3 引物按厂家提供的方法进行。

### 1.9 Northern 印迹分析

取不同发育阶段的 RNA 样品 20 $\mu$ g, 在含 EB 的甲醛变性 Agarose 胶上电泳<sup>[9]</sup>。电泳后将凝胶在 10xSSC 中浸泡 20min, 0.5xTBE 中 10min, 然后在 0.5xTBE 中将 RNA 电转移到 Zeta-Probe 膜上, 经 80℃ 烤膜 1h 后即可进行杂交。滤膜于 10%Dextran sulfate, 1%SDS, 1mol/L NaCl, 50 $\mu$ g/ml 变性鱼精 DNA 中 65℃ 预杂交 2h, 然后加入用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记的 OC-1 DNA 探针于 65℃ 杂交过夜。按文献 [9] 的方法洗杂交膜及进行放射自显影。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (OC-1) 基因的克隆

根据已发表的 OC-1 基因序列<sup>[9]</sup>设计了两个分别对 OC-1 基因 5' 末端和 3' 末端序列特异的寡核苷酸引物。为了以后克隆的方便及利于在植物中表达, 在 5' 端引物 OC-1 基因翻译起始密码子 ATG 前面加上了 BamHI 识别序列及植物基因比较保守的 Kozak 序列, 3' 端引物翻译终止密码子后面加上了 XhoI 识别序列。这样用这两个引物扩增出的 OC-1 基因片段大小应为 329bp。从孕穗期的稻穗中提取总 RNA, 以此为模板, 合成了 ss-cDNA。以 ss-cDNA 为模板进行 PCR 后, 反应产物的电泳图谱见图 1 所示。图 1 结果证明用材料与方法中所述的方法可以从水稻幼穗总 RNA 的 cDNA 扩增出预期大小的 OC-1 基因片段 (约 330bp), 这样可省去提取 mRNA 的繁琐步骤。

用平头连接将以上 PCR 产物克隆到 pBluescript SK<sup>+</sup> 的 EcoRV 位点后选了几个有插入的克隆, 经用 BamH I -Xho I 双酶切证明插入的片段大小与 PCR 产物大小相同 (资料略)。取两个克隆的质粒 DNA 按材料与方法所述进行了插入片段的序列分析, 结果表明所选到的克隆确为水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆, 其序列编码 102 个氨基酸与 Abe 等<sup>[8]</sup>报道的完全一致 (序列结果略)。

### 2.2 水稻 RNA 的 Northern 印迹分析

一般认为蛋白酶抑制剂基因主要是在种子中表达和积累其产物的, 所以往往是从受粉后的幼胚中提取 mRNA 进行 cDNA 合成和克隆。我们从幼穗的 RNA 中克隆到了 OC-1 基因的结果表明该基因在水稻的其它组织中可能也有表达。为了进一步了解 OC-1 基因在水稻中的表达特点, 用水稻不同发育时期叶片的总 RNA 及孕穗期不同器官 (叶、根、茎及幼穗) 的 RNA 进行了 Northern 杂交分析, 初步结果如图 2 所示。结果表明除在刚刚萌发的籽苗、幼穗及茎中表达很弱或无表达外 (泳道 3, 10 和 9), OC-1 基因在苗期、分蘖期、拔节期、孕穗期、抽穗期和灌浆期的叶中都有较高的表达 (分别为泳道 4、5、6、7、2 和 1)。表达量略有差别, 从杂交带的深浅程度估计差别最多达 10 倍。在孕穗期根中 (泳道 8) 的表达水平比叶中的水平要低。OC-1 mRNA 的分子量约为 700nt 长, 与 Abe 等<sup>[8]</sup>用授粉后的水稻种子 RNA 进行的 Northern 分析结果一致。这反映了该 RNA 含有一个比较长的 3' 端

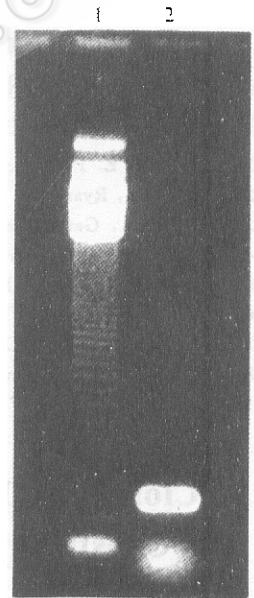


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳  
泳道 1. 123bp DNA Ladder,  
泳道 2. PCR 扩增产物

非翻译区。虽然我们没有从种子中分离 RNA, 所以未能与种子中的表达水平进行比较, 但从以上结果可以初步认为 OC-1 基因在水稻中并非发育阶段特异性或组织特异性表达而起码在 mRNA 水平上是一种组成型表达。这种表达方式对水稻的生长发育及水稻与病虫害的相互作用中的意义有待进一步研究, 而且还需要从蛋白表达水平上的研究进一步确定。

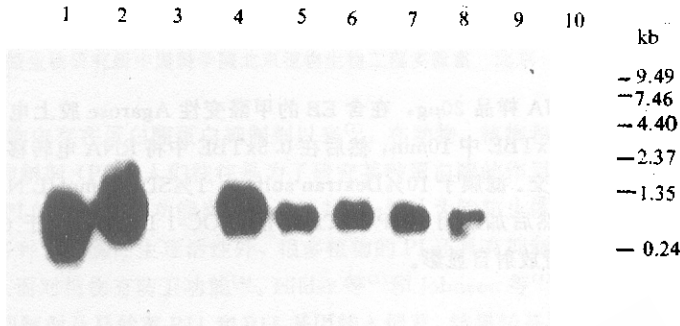


图 2 水稻 RNA 的 Northern 印迹分析

泳道 1~7 分别为水稻灌浆期、抽穗期、籽苗(带 1~2 个真叶的小苗)、苗期、分蘖期、拔节期和孕穗期叶片的 RNA; 泳道 8~10 分别为孕穗期的根、茎和穗的 RNA。图右侧为共电泳的 RNA 分子量标准。

### 参 考 文 献

- [1] Bowman D E. Proc Soc Exp Biol Med, 1944, 57: 139~140.
- [2] Green T R, Ryan C A. Science, 1972, 175: 776~777.
- [3] Hilder V A, Gatehouse A M R, Sheerman S E *et al.* Nature, 1987, 330: 160~163.
- [4] Johnson R, Narvaez J, An G *et al.* PNAS USA, 1989, 86: 9871~9875
- [5] Ryan C A. Annu Rev Phytopathol, 1987, 28: 425~449.
- [6] Masoud S A, Johnson L B, White F F *et al.* P1 Mol Biol, 1993, 21: 655~663.
- [7] Verwoerd T, Dekker C B M M, Hoekeman A. Nucleic Ac: d Res, 1989, 7 (1): 2362.
- [8] Abe K, Emori Y, Kondo H *et al.* J Biol Chem, 1987, 262: 16793~16796.
- [9] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Cloning of Rice Cysteine Proteinase Inhibitor Gene and Constitutive Expression of Its mRNA in Rice Plants

E Chaosu Tian Yingchuan Wang Qun Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Plant Biotechnology  
Laboratory, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** To study the physiological functions of plant proteinase inhibitors and its potential application in genetic modification of plants for pathogen-or insect-resistance, a gene coding for rice cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin1, OC-1) was amplified from rice cDNAs using PCR technique and cloned in *E. coli*. Its nucleotide sequence was determined. The preliminary results of Northern blot analysis of rice RNA, using the cloned OC-1 gene as a probe suggested a constitutive expression pattern for OC-1 in rice plants.

**Key words** Rice, cysteine proteinase inhibitor gene, constitutive expression