

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 学位论文

水稻三个组培诱导突变体的鉴定与基因克隆

**Characterization of three mutants induced by rice tissue culture**

博士研究生：朱 丽

指导教师：孙宗修 研究员

申请学位类别：理 学 博 士

专 业：生物化学与分子生物学

研 究 方 向：水稻功能基因组学

培 养 单 位：研 究 生 院

中国水稻研究所

提交日期 2007 年 5 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences**  
**Ph.D Dissertation**

**Characterization of three mutants induced by rice tissue culture**

Ph.D Candidate : Zhu Li

Advisor : Prof. Sun Zongxiu

Major : Biology Chemistry & Molecular Biology

Specialty : Functional Genomics in Rice

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

**本研究得到**

**国家高技术研究发展计划**

**( 2002AA2Z1001)**

**973计划水稻高产等重要农艺性状相关功能基因研究**

**( G19990116-1 和 2005CB120801)**

**和**

**国家转基因植物研究与产业化专项 ( FY03-B-07) 的资助**

**This research was supported**

**by**

**Hi-Tech Research and Development Program of China**

**(Grant No. 2002AA2Z1001)**

**National Basic Research Program of China(973)**

**(Grant No. G19990116-1 and 2005CB120801)**

**and**

**GM Plant Research and Industrialization Program of China**

**(Grant No.FY03-B-07)**

# 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

# 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月

**中国农业科学院  
博士学位论文评阅人、答辩委员会名单表**

|                  |     |                     |          |              |                |         |
|------------------|-----|---------------------|----------|--------------|----------------|---------|
| 论文题目             |     | 水稻三个组培诱导突变体的鉴定与基因克隆 |          |              |                |         |
| 论文作者             |     | 朱丽                  | 专 业      | 生物化学与分子生物学   | 研究方向           | 水稻功能基因组 |
| 指导教师             |     | 孙宗修研究员              |          | 培养单位（研究所、中心） |                | 中国水稻研究所 |
| 姓名               |     | 职称                  | 硕(博)     | 单 位          | 专 业            | 签 名     |
| 评<br>阅<br>人      | 林鸿宣 | 研究<br>员             | 硕导<br>博导 | 中科院上海生命科学研究院 | 遗传学            |         |
|                  | 张红生 | 教授                  | 硕导<br>博导 | 南京农业大学       | 作物遗传育<br>种学    |         |
|                  | 郑康乐 | 研究<br>员             | 硕导<br>博导 | 中国水稻所        | 遗传学            |         |
| 答<br>辩<br>主<br>席 | 钱前  | 研究<br>员             | 硕导<br>博导 | 中国水稻所        | 水稻生物学          | 钱前      |
| 答<br>辩<br>委<br>员 | 陈剑平 | 研究<br>员             | 硕导<br>博导 | 浙江农业科学院      | 生物化学与<br>分子生物学 | 陈剑平     |
|                  | 周雪平 | 教授                  | 硕导<br>博导 | 浙江大学         | 生物学            | 周雪平     |
|                  | 王慧中 | 教授                  | 硕导<br>博导 | 杭州师范大学       | 分子遗传学          | 王慧中     |
|                  | 陶跃之 | 研究<br>员             | 硕导<br>博导 | 浙江农业科学院      | 分子生物学          | 陶跃之     |
|                  | 朱睦元 | 教授                  | 硕导<br>博导 | 浙江大学         | 基因工程           | 朱睦元     |
|                  | 庄杰云 | 研究<br>员             | 硕导<br>博导 | 中国水稻所        | 分子生物学          | 庄杰云     |
| 会议记录（秘书）         |     | 胡国成                 |          |              |                |         |
| 论文答辩时间地点         |     | 2007-6-13           |          |              |                |         |

## 摘 要

各种突变体库的构建和集中保存,为分子生物学和育种学研究提供了巨大的资源平台。在突变体库的构建基础上,发现并利用突变体,克隆功能基因,揭示水稻重要农艺性状的分子机理、调控途径已经成为功能基因组学研究中最为紧迫的任务。T-DNA插入法构建突变体库的优势在于,如果连锁分析结果显示突变体是由插入事件引起,利用TAIL-PCR等方法便能迅速找到插入位点,突变基因的确定时间可缩短在一周以内;如果是由组织培养诱导的突变,则通过图位克隆的方法寻找突变基因,从而提高了突变体库的利用效率。图位克隆的方法进行功能基因组研究,不受变异来源所限制,应用范围广泛。水稻基因组全序列的测定完成,大大降低了图位克隆所需的多态性分子标记的筛选难度,缩减了成本、提高了效率。

我们在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中,发现了三个以日本晴为遗传背景的突变体:温度钝感型淡绿叶突变体 $pgl2$ (pale green leaf 2);温度敏感型黄绿叶突变体 $ypgll(t)$ (yellow pale green leaf 1, temporally);斑点叶突变体 $spl19$ (spotted leaf 19),并对这3个突变体进行了形态学鉴定、遗传分析和初步的生理学研究,克隆了 $Ypgll(t)$ 和 $Spl19$ 基因并进行了部分功能研究。主要结果如下:

1. 潮霉素浸泡及PCR扩增结果显示,温度钝感型淡绿叶突变体 $pgl2$ 不是由T-DNA插入引起。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交,构建F<sub>2</sub>群体对突变基因进行精细定位。初定位结果显示目的基因与第8染色体SSR标记RM331连锁度较高,在该标记附近发展了14对INDEL标记,将突变基因进一步定位于着丝粒上2.37 Mb的区间,并对该区间候选基因进行了分析。突变体叶绿素的总量与对照相仿,但是叶绿素a/b比值趋于1,明显低于对照。推测突变基因可能与叶绿素a、b间的转化有关。研究结果为该基因的图位克隆奠定了基础。

2. 共分离分析表明温度敏感型黄绿叶突变体 $ypgll(t)$ 不是由T-DNA插入引起。遗传学分析结果显示该突变性状是由一对单隐性核基因控制。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交,构建F<sub>2</sub>群体对突变基因进行精细定位。初定位结果显示目的基因与第7染色体SSR标记RM11连锁度较高,在RM11两端附近进一步发展了22对INDEL标记,最终将突变基因定位于INDEL标记YT6132和YT614之间10.3kb的序列内,该区间有两个预测基因均编码未知蛋白,测序结果显示 $Ypgll(t)$ (KOME Accession No. AK062845)基因发生54个碱基的缺失突变,根据基因结构预测功能发现,该基因编码一个介导蛋白互作的锚蛋白。RT-PCR证明突变体中 $Ypgll(t)$ 仍可正常表达。突变体与野生型电镜观察显示前者叶绿体发育异常,嗜锻滴大量集聚。温控试验结果表明,该突变体在30℃的温度条件生长时,表现为明显的黄叶表型,但当温度33℃时则转变为淡绿色。突变体叶绿素a、b的含量均大幅减少,24 h时,叶绿素b减幅大于叶绿素a,造成叶绿素a/b比值达到19.2,随着温度上升叶绿素b快速增加,33℃以后叶绿素a/b比值基本趋于正常(3左右),不同温度下野生型叶绿素a、b的含量和a/b比值变化不大。

3. 泛素结合酶E2催化泛素分子从E1半胱氨酸残基转移给E2活化的半胱氨酸位点,进而通过相同的基序与E3连接,最终将泛素分子连接到靶蛋白上,成为蛋白特异降解的标记。泛

素化途径是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径。斑点叶突变体 *spl19* 从三叶期开始出现小的铁锈斑点，随着新叶片的生长，老叶片斑点逐步扩大直至叶尖部分黄化枯死，衰老表现明显早于对照。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。潮霉素浸泡及 PCR 扩增结果显示，该突变并非由 T-DNA 插入引起。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交，构建 F2 群体对突变基因进行定位。经过初定位、精细定位，最后将突变基因定位于 INDEL 标记 PSE55 和 PSE62 之间 67.5kb 的序列内，该区间有 13 个预测基因，其中有两个编码泛素结合酶。测序结果显示 *Spl19* 基因内部插入一段来自于第 7 染色体 Tos17 上约 4.1kb 的序列，RT-PCR 结果表明突变体中插入位点前的目的基因序列仍然发生转录，插入位点后的序列无转录产物。利用生物信息学工具，根据基因结构预测功能发现，该基因可能编码一个介导蛋白特异性降解的泛素结合酶。

关键词：图位克隆，着丝粒，淡绿叶突变体，温度敏感型黄绿叶突变体，锚蛋白，斑点叶突变体，泛素结合酶

## Abstract

Various phenotypic and physiological mutants provide an indispensable source for functional analysis of genes. Recent advances in genomic studies and the sequenced genome information have made it possible to utilize phenotypic mutants for characterizing relevant genes at the molecular level and reveal their functions. The collection and positioning of many pieces of genes in the developmental and physiological pathways will decipher the many gene networks and thus determine the morphological and developmental regulations for those gene networks. Many somaclonal variations were induced during tissue culture in T-DNA insertion mutant library. However, Map-based cloning strategy which was not limited by origin of mutant has been an essential tool on rice functional genomics study. Many genes presently isolated were identified via map-based cloning. With accomplish of the rice genome sequence project, cloning gene with map-based cloning strategy was become more and more rapidly and efficiently.

Three mutants induced by tissue culture , i.e. thermo-insensitive pale green leaf mutant (*pgl2*), thermo-sensitive yellow pale green leaf mutant (*ypgl1(t)*) and spotted leaf mutant (*spl19*), were isolated from our T-DNA insertion mutant populations of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *Japonica*, cv. Nipponbare). The morphology, genetics and physiology of three mutants involved were analyzed. Mainly results were as follows:

1. A thermo-insensitive pale green leaf mutant (*pgl2*) which was not co-segregated with the T-DNA insertion, isolated from T-DNA inserted transgenic lines. Genetic analysis indicated that the phenotype was controlled by a recessive mutation in a single nuclear-encoded gene. To map the *PGL2* gene, an F<sub>2</sub> population was constructed by crossing the mutant with Longtepu (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*). The *PGL2* locus was roughly linked to SSR marker RM331 on chromosome 8. Therefore, 14 new INDEL markers were developed around the marker. *PGL2* was further mapped to a 2.37 Mb centromeric region. Chlorophyll contents of leaves were measured. There was no obvious difference between the mutant and wild type in total chlorophyll content, while the ratio of Chl a / Chl b in the mutant was only about 1, which was distinctly lower than in the control. These data suggested that the *PGL2* gene is related to the transformation between Chl *a* and Chl *b*.

2. A thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant was isolated from more than 15000 transgenic rice lines. The mutant displayed yellow leaf phenotype at 30 °C or lower temperature. However, when grown at 33 °C or higher the plant exhibited another phenotype characterized by pale green leaf. Genetic analysis revealed that a single nuclear-encoded recessive gene is responsible for the mutation, which is tentatively designed as *ypgl1(t)* (yellow pale green leaf 1, temporally). PCR analysis and hygromycin resistance assay indicated the mutation was not caused by T-DNA insertion. To isolate the *Ypgl1(t)* gene, a map-based cloning strategy was employed and 22 new InDels markers were developed. A high-resolution physical map of the chromosomal region around the *Ypgl1(t)* gene was made using F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> population consisting of 5139 mutant individuals. Our initial mapping efforts with SSR markers placed the *Ypgl1(t)* locus near the SSR marker RM11 (67 cM) on chromosome 7. Finally, the *Ypgl1(t)* gene was mapped in a 10.3kb region between marker



YT6132 and marker YT614. Sequence analysis revealed two candidate genes in target region. Cloning and sequencing of the target region from the *ypgll(t)* mutant showed that a deletion mutation occurred in the mutant. The mutant gene (KOME Accession No. AK062845) was identified as the *OsYpgll(t)* gene. The result of bioinformatic analysis showed that *OsYpgll(t)* gene contains two exons and one intron, and encodes a protein containing an ankyrin repeat domain. Nevertheless, the molecular function of *OsYpgll(t)* gene was unknown in rice. RT-PCR analysis indicated that *OsYpgll(t)* gene was successfully transcribed in mutant. The third-leaves from 30-day old wild-type and *ypgll(t)* mutant seedlings were used for electron microscopic observation. The osmiophilic droplet were increased and assembled in *ypgll(t)* mutant chloroplasts. Total chlorophyll contents of mutant significant decrease compared with wild type grown at the same condition. However, the ratio of Chl *a* / Chl *b* in the mutant at 24 was 19.21, and no distinct differences at 33 between the wild type and the mutant.

3. Ubiquitin-conjugating enzyme E2s catalyze covalent attachment of ubiquitin to target proteins, or, when acting along with HECT domain E3s, transfer of the activated ubiquitin moiety to a highenergy E3 ubiquitin intermediate. They all share an active-site ubiquitin-binding Cys residue. Regulated protein degradation plays a crucial role during development in all organisms. One mechanism for proteolysis in eukaryotes is the ubiquitin-proteasome pathway. A spotted leaf mutant (*spl19*) was isolated from T-DNA inserted transgenic lines. The mutant showed relatively small, reddish brown lesions scattered over the whole surfaces of leaves. Under natural summer field conditions, the lesions appeared from the tillering stage and continuously increased to heading time until leaf died. No lesions appeared on seedlings or young leaves in wide type. Genetic analysis revealed that a single nuclear-encoded recessive gene is responsible for the mutation, which is tentatively designed as the *Spl19* gene. PCR analysis and hygromycin resistance assay indicated the mutation was not caused by T-DNA insertion. To isolate the *Spl19* gene, a map-based cloning strategy was employed. A high-resolution physical map of the chromosomal region around the *Spl19* gene was made using F2 and F3 population mutant individuals. Finally, the *Spl19* gene was mapped in 67.5kb region between INDELs marker PSE55 and PSE62. Sequence analysis revealed 13 candidate genes in target region. Cloning and sequencing of the target region from the *spl19* mutant showed that a fragment sequence come from Tos17 about 4.1kb on chromosome 7 reversely inserted in the exon 8 of *Spl19* gene. The *Spl19* gene encodes a putative ubiquitin-conjugating enzyme. RT-PCR analysis indicated that sequence of *Spl19* gene which ahead of inserted site was successfully transcribed, and sequence of *Spl19* gene which behind of inserted site was not transcribed in mutant. However, the whole *Spl19* gene was successfully transcribed in wide type.

**Key words:** Fine Mapping, Centromere, *pgl2* (pale green leaf mutant), *ypgll(t)* (yellow pale green leaf 1, temporally), Ankyrin, *spl19* (spotted leaf 19), Ubiquitin Conjugating Anzyme

# 目 录

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| 摘 要.....                        | I    |
| Abstract.....                   | III  |
| 缩略词表.....                       | VIII |
| 第一部分 文献综述.....                  | 1    |
| 第一章 水稻功能基因组研究.....              | 1    |
| 1 发现新基因.....                    | 1    |
| 1.1 从表型到基因 突变体库的构建及利用.....      | 1    |
| 1.2 从基因到表型 反向遗传学研究.....         | 7    |
| 2 基因表达产物及其功能分析.....             | 9    |
| 2.1 功能互补及过表达分析.....             | 9    |
| 2.2 转录水平分析.....                 | 10   |
| 2.3 蛋白质组研究.....                 | 11   |
| 第二章 水稻组培诱导突变.....               | 14   |
| 1. 体细胞无性系变异的突变类型.....           | 14   |
| 2 体细胞无性系变异的遗传.....              | 14   |
| 3 体细胞无性系变异的影响因素.....            | 15   |
| 4 体细胞无性系变异的分子机理.....            | 15   |
| 4.1 基因突变.....                   | 16   |
| 4.2 逆转录转座子激活.....               | 16   |
| 第三章 水稻着丝粒 DNA序列研究及基因注释.....     | 17   |
| 1.水稻着丝粒区间序列研究.....              | 17   |
| 2.水稻第 8 染色体着丝粒区间基因组分析及功能注释..... | 20   |
| 2.1 着丝粒 DNA 序列分析.....           | 20   |
| 2.2 着丝粒 DNA 基因功能注释.....         | 20   |
| 第四章 植物锚蛋白.....                  | 23   |
| 1. ANK 的结构特征.....               | 23   |
| 2 植物锚蛋白功能研究.....                | 25   |
| 2.1 锚蛋白参与自身防御.....              | 25   |
| 2.2 锚蛋白参与物质运输.....              | 25   |
| 2.3 锚蛋白参与发育调控.....              | 26   |
| 2.4 锚蛋白激酶.....                  | 27   |
| 2.5 锚蛋白与细胞骨架相互作用.....           | 27   |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6 锚蛋白重复序列与泛素连接酶 .....                  | 28        |
| <b>第五章 蛋白质的泛素化系统 .....</b>               | <b>29</b> |
| 1.泛素化系统的组成 .....                         | 29        |
| 1.1 泛素 .....                             | 29        |
| 1.2 泛素激活酶 .....                          | 30        |
| 1.3 泛素结合酶 .....                          | 30        |
| 1.4 泛素连接酶 .....                          | 31        |
| 1.5 蛋白酶体 .....                           | 33        |
| 1.6 脱泛素酶 .....                           | 33        |
| 2 泛素化系统的功能研究 .....                       | 34        |
| 2.1 泛素化系统调节的蛋白降解 .....                   | 34        |
| 2.2 细胞膜受体蛋白的修饰 .....                     | 34        |
| 2.3 一些前体物质的加工 .....                      | 34        |
| 2.4 泛素化系统参与免疫应答 .....                    | 35        |
| <b>第六章 本研究的目的意义 .....</b>                | <b>36</b> |
| <b>第二部分 研究报告 .....</b>                   | <b>37</b> |
| <b>第一章 水稻着丝粒附近一个淡绿叶突变相关基因的定位分析 .....</b> | <b>37</b> |
| 1 材料与方法 .....                            | 38        |
| 1.1 材料 .....                             | 38        |
| 1.2 方法 .....                             | 38        |
| 2 结果与分析 .....                            | 41        |
| 2.1 突变体表型及遗传分析 .....                     | 41        |
| 2.2 突变体与 T-DNA 共分离分析 .....               | 41        |
| 2.3 突变体光合参数的变化 .....                     | 41        |
| 2.4 PGL2基因的染色体定位 .....                   | 43        |
| 2.5 PGL2基因的精细定位 .....                    | 43        |
| 3 讨论 .....                               | 43        |
| <b>第二章 一个温敏型水稻黄绿叶突变相关基因的精细定位与功能研究 ..</b> | <b>48</b> |
| 1 材料与方法 .....                            | 48        |
| 1.1 材料 .....                             | 48        |
| 1.2 方法 .....                             | 49        |
| 2.结果与分析 .....                            | 54        |
| 2.1 突变体表型 .....                          | 54        |
| 2.2 突变体的遗传学分析 .....                      | 54        |
| 2.3 突变体与 T-DNA 共分离分析 .....               | 56        |
| 2.4 突变体不同温度下叶绿素、类胡萝卜素含量的变化 .....         | 56        |
| 2.5 不同温度条件下突变体与野生型叶绿体电镜观察及叶片切片观察 .....   | 56        |
| 2.6 <i>Ypgl1(t)</i> 基因的初定位分析 .....       | 57        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.7 <i>Ypgll(t)</i> 基因的精细定位 .....           | 57         |
| 2.8 <i>Ypgll(t)</i> 定位区间的候选基因及突变基因的测序 ..... | 59         |
| 2.9 <i>OsYpgll(t)</i> 基因的 RT-PCR 分析.....    | 63         |
| 2.10 构建 <i>OsYpgll(t)</i> 基因的干涉载体验证功能.....  | 64         |
| 3 讨论.....                                   | 64         |
| <b>第三章 水稻斑点叶突变相关基因的精细定位与功能研究 .....</b>      | <b>67</b>  |
| 1 材料与方法 .....                               | 67         |
| 1.1 材料.....                                 | 67         |
| 1.2 方法.....                                 | 67         |
| 2.结果与分析.....                                | 68         |
| 2.1 突变体表型.....                              | 68         |
| 2.2 突变体的遗传学分析.....                          | 68         |
| 2.3 突变体与 T-DNA 共分离分析.....                   | 69         |
| 2.4 突变体与野生型光合参数测定及叶片形态观察.....               | 69         |
| 2.5 <i>Spl19</i> 基因的初定位分析.....              | 69         |
| 2.6 <i>Spl19</i> 基因的精细定位.....               | 70         |
| 2.7 <i>Spl19</i> 定位区间的候选基因及突变基因的测序.....     | 70         |
| 2.8 <i>Spl19</i> 基因的 RT-PCR 分析.....         | 70         |
| 2.9 构建 <i>Spl19</i> 基因的干涉载体验证功能.....        | 71         |
| 3.讨论.....                                   | 71         |
| <b>第四章 全文结论.....</b>                        | <b>74</b>  |
| <b>参考文献.....</b>                            | <b>76</b>  |
| <b>附录 A主要化学试剂、分子生物学试剂及仪器 .....</b>          | <b>100</b> |
| <b>附录 B主要培养基母液、缓冲液配方及配制方法 .....</b>         | <b>101</b> |
| <b>致    谢.....</b>                          | <b>103</b> |
| <b>作 者 简 历.....</b>                         | <b>104</b> |

## 缩略词表

| 缩写            | 英文   | 中文             |
|---------------|--|----------------|
| 6-BA          | 6-benzy laminpurine                          | 6-苄基氨基嘌呤       |
| BAC           | Bacterial artificial chromosome              | 细菌人工染色体        |
| bp            | base pair                                    | 碱基对            |
| CaMV35S       | Cauliflower mosaic virus 35S promoter        | 花椰菜花叶病毒 35S启动子 |
| cDNA          | complementary DNA                            | 互补 DNA         |
| dNTP          | eoxyribonuceleoside triphosphate             | 脱氧核糖核苷三磷酸      |
| EDTA          | Didodium ethylenediaminetetra-acetate        | 乙二胺四乙酸         |
| GUS           | β-glucuronidase                              | β-半乳糖苷酶        |
| HYG           | hygromycin B                                 | 潮霉素 B          |
| HPT           | hygromycin phosphotransferase                | 潮霉素磷酸转移酶       |
| Km            | kanamycin                                    | 卡那霉素           |
| Mb            | Megabase                                     | 兆碱基            |
| ORF           | Open Reading Frame                           | 开放阅读框          |
| PAGE          | Polyacrylamide gel electrophoresis           | 聚丙烯酰胺凝胶电泳      |
| PCR           | polymerase chain reaction                    | 聚合酶链反应         |
| RNAi          | RNA interference                             | RNA 干涉         |
| SDS           | sodium dodecylsulphate                       | 十二烷基磺酸钠        |
| TAIL-PCR      | Thermal asymmetric interlaced PCR            | 温度不对称 PCR      |
| T-DNA         | transferred DNA                              | 转移 DNA         |
| Tris          | Trishydroxymethyl-aminomethane               | 三羟甲基氨基甲烷       |
| Ac/Ds         | Activator/Dissociation                       | 自主性转座子/非自主性转座子 |
| cM            | CentiMorgan                                  | 厘摩尔根           |
| <i>E.coli</i> | <i>Eschericia coli</i>                       | 大肠杆菌           |
| EST           | Expressed sequence tag                       | 表达序列标签         |
| CEN           | Centromere sequence                          | 着丝粒序列          |
| CENH          | Centromeric histone                          | 着丝粒结合的组氨酸      |
| GA            | Gibberellane acid                            | 赤霉素            |
| GFP           | Green fluorescent protein                    | 绿色荧光蛋白         |
| IRGSP         | International Rice Genome Sequencing Project | 国际水稻基因组测序计划    |
| kb            | Kilobase                                     | 千碱基            |
| LB            | Luria broth                                  | LB 培养基         |
| LTR           | Long terminal repeat                         | 长末端重复          |
| mL            | Millilitre                                   | 毫升             |

|         |  |               |
|---------|--|---------------|
| Mol     | Molar                                    | 摩尔            |
| PAC     | P1-derived artificial chromosome         | P1 人工染色体      |
| BAC     | Bacterial artificial chromosome          | 细菌人工染色体       |
| RAPD    | Random amplified polymorphic DNA         | 随机扩增多态性 DNA   |
| rpm     | Revolutions per minute                   | 每分钟转速         |
| RT-PCR  | Reverse transcriptional-PCR              | 反转录-PCR       |
| SSR     | Simple sequence repeat                   | 简单重复序列        |
| Taq     | Thermus aquaticus DNA polymerase         | 嗜热水生菌 DNA 聚合酶 |
| TILLING | Targeting Induced Local Lesion In Genome | 基因组局部诱变的定向检测  |
| RFLP    | Restriction Fragment Length Polymorphism | 限制片段长度多态性     |
| E1      | Ubiquitin activating enzyme              | 泛素激活酶         |
| E2      | Ubiquitin conjugating enzyme             | 泛素结合酶         |
| E3      | Ubiquitin ligating enzyme                | 泛素连接酶         |

## 第一部分 文献综述

### 第一章 水稻功能基因组研究

水稻基因组测序计划的全面完成 ( Yu et al. 2002, Goff et al. 2002, Sasaki et al. 2002b, Feng et al. 2002, IRGSP 2005 ) , 标志着水稻基因组研究进入了后基因组学 (postgenomics)时代, 亦称功能基因组学(functional genomics)时代。功能基因组学主要是在基因组水平上分析基因的生物学功能、表达产物间的互作关系以及在植物生长发育、代谢调控、信号传导、环境应答等过程中的作用, 这将是比以测序为目标的基因组计划更艰巨、意义更深刻的任务。目前已知水稻大约有50000个注释基因 ( Han et al,2007 ) , 在巨大商业前景驱使下, 各国政府和商业公司纷纷斥巨资投入对水稻功能基因组学的研究, 期望分离具有重要农艺性状 (如高产、优质及抗逆等) 的基因并拥有其专利权。中国水稻的栽培历史悠久, 品种资源丰富, 发展适合我国国情的基因研究体系, 克隆具有自主知识产权的基因, 对我国的遗传学研究和转基因作物商业化都非常重要。

#### 1 发现新基因

结构基因组学提供的海量序列信息为揭示和开发控制重要农艺性状的功能基因开辟了广阔的前景。水稻基因功能的深入研究不仅可为水稻的品种改良创造便利条件, 而且还可为其它禾本科作物的基因克隆、功能注释及应用提供有益信息。变异是功能分析的基础, 从基因型与表型对应关系来看, 研究基因功能的方法可归纳为对两种突变类型的探索: 从突变体的表型出发, 研究 基因是什么? ; 改变物种原有基因序列, 观察表型变化。

##### 1.1 从表型到基因 突变体库的构建及利用

突变体是功能基因组学研究的重要材料。纵观生物学发展历史, 从经典遗传学规律的发现到拟南芥大量基因功能的揭示, 从两次绿色革命的引发到快速高效的良种繁育, 都与突变体的发现与利用密切相关。突变体可以自然发生, 也可以由人工诱变产生, 自然产生突变的频率较低, 而人工诱变可以在短时间内产生大量突变体。为了加快功能基因组学研究的进程, 人工诱变就成为科研工作者的首选。20世纪70年代以来, 各国的科学家已经利用物理诱变 (physical mutagenesis)、化学诱变(chemical mutagenesis)和插入诱变(insertional mutagenesis)等方法构建了大量的水稻突变体库, 一系列控制重要农艺性状的基因被克隆(Sasaki et al. 2002a, Li et al. 2003a, Li et al. 2003b, Wang et al. 2006 , Yang et al. 2007)。

### 1.1.1 突变体库的分类及构建策略

通常水稻突变可按以下三种方法进行分类：按产生水稻突变体的方法可分为自然突变、物理化学诱变、DNA插入突变；按遗传背景可分为普通突变体库、近等基因系突变体库和等基因系突变体库；按引起突变的分子机制可分为功能丧失性突变和功能获得性突变(Loss-of-function mutation and Gain-in-function mutation)(引自孙宗修私人资料)。目前水稻突变体的构建主要有以下方法：自然突变。该突变体库是在长期的自然选择和人工选择过程中积累起来的，包含极为丰富的突变，但是突变体的来源非常复杂，遗传背景差异大，研究困难大，而且自然条件下的突变频率很低，在大规模、高通量的功能基因组研究中显得力不从心；物理化学诱变。用物理、化学手段产生的形态各异的突变体为早期的遗传作图提供了重要的形态标记。到上世纪末为止，超过2200个被推广的作物品种是通过理化诱变产生的，其中有434个是水稻品种(Maluszynski et al. 2000)。中国水稻研究所(CNRRRI)，国际水稻研究所(IRRI)和日本的农业生物资源研究所(NIAS)等研究机构均利用理化诱变方法构建了水稻的突变体库(朱旭东等 2003, 郭龙彪等 2006, Hirochika et al. 2004, Wu et al. 2005)。物理、化学诱变可快速获得较广的突变谱和稳定的遗传变异，产生多位点变异，容易构建饱和的突变体库。然而突变的随机化和多位点突变，大大增加了随后基因分析、克隆的工作量和难度。插入突变。插入突变主要包括T-DNA插入诱变和转座子(包括Ac/Ds、Spm/dSpm、Tos17等)插入诱变，它是利用遗传转化技术和转座子随机转座的原理将T-DNA或转座子插入到基因组中破坏某个功能基因而导致突变。中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室，先后以中花11和日本晴为受体，已获得了45000多个独立T-DNA插入的水稻转基因株系，分离了一千多个性状可见的突变体，突变体库中包括了致死、叶色、株型、育性、熟期、穗型、早衰等类型的突变体(朱正歌等 2001)。华中农业大学和中科院微生物所也分别构建了31443 和5200个独立T-DNA插入的转基因突变体株系(Wu et al. 2003, Sha et al. 2004)。此外，韩国、新加坡、中国台湾、美国 and 法国等国家和地区也分别构建了T-DNA插入的突变体库，获得至少200,000份独立T-DNA插入突变体，为水稻功能基因组研究提供了资源平台(Jeon et al. 2000, Jeong et al. 2002, Ryu et al. 2004, Yin and Wang 2000, Barakat et al. 2000, Sallaud et al. 2003, Sallaud et al. 2004, Hirochika et al. 2004, An et al. 2005)。转座子(transposon)是染色体上一段可移动的DNA片段，它可从染色体的一个位置跳到另一个位置。当转座子跳跃而插入到某个功能基因时，就会引起该基因的失活，诱导产生突变型，而当转座子再次转座或切离这一位点时，失活基因的功能又可得到恢复。遗传分析可确定某基因的突变是否由转座子引起。用于构建水稻突变体库的转座子有来源于玉米的Ac/Ds系统、Spm/dSpm系统和来自于水稻自身的Tos17逆转录转座子。Ac/Ds系统是玉米中的一个转座子家族。Ac含有编码转座酶的基因，可自主转座，但变异不稳定，Ds具有与Ac相同的转座必需区间，但不编码转座酶，是一种典型的非自主型转座子，必须在有转座酶存在的条件下，才会引起插入突变。利用自主元件Ac和非自主元件Ds的作用机理，Ac-Ds共存的情况下发生转座，分离Ac和Ds元件后，便可获得稳定的Ds插入突变体(朱正歌等 2001)。Ds因子以非复制的方式转座即所谓“切粘”机制；但也会在染色单体间发生基因转换，使转座子拷贝数增多。以Ac/Ds为代表的转座子标签法不仅具有T-DNA插入突变法拷贝数少，遗传稳定的优点，而且还可通过Ac和Ds的杂交获得新的转座事件，



从而避免了构建T-DNA 插入突变库时为获得数以万计的转基因植株所投入的巨大人力和物力(栾维江和孙宗修2005)。Spm/dSpm系统的作用原理和Ac/Ds 系统相似。逆转录转座子Tos17是存在于水稻基因组中的一种逆转录因子,每个基因组中有一个或数个拷贝(依不同品种而不同),所有的Tos17在基因组中可以稳定遗传。在正常情况下,Tos17没有转座活性,但在组织培养,物理化学诱变剂处理等特殊条件下,Tos17的逆转座活性被激活,合成新的Tos17逆转座子并随机整合到基因组中,而这些新整合的Tos17同样也能稳定遗传(Hirochika et al. 1996, Hirochika 2001),逆转录转座子的增殖均以RNA为中介,通过DNA-RNA-DNA的方式进行,涉及逆转录过程,因而被称为逆转录转座子(retrotransposon)。与T-DNA插入不同的是Tos17在基因组中的插入位置存在明显的偏爱性,激酶,抗病相关基因家族是它们的高频插入位点,而且Tos17DNA甲基化程度影响其转座活性并调节邻近基因的表达(Cheng et al. 2006, An et al. 2005)。日本国立农业生物资源研究所通过组织培养获得50000个独立株系的Tos17插入突变体库,发现53种不同的突变表型,大量Tos17的旁邻序列经过分析后被作图到水稻基因组上(Miyao et al. 2007, <http://www.rgrc.dna.affrc.go.jp/>)。近年来,众多研究机构建立了大量的插入突变体(Chin et al. 1999, Greco et al. 2001, Kohli et al. 2001, Kim et al. 2004, Kolesnik et al. 2004, Ito et al. 2004, Jin et al. 2004, Sallaud et al. 2004, Kurata et al. 2005)。在水稻中除了已经大量研究的外源转座子T-DNA, Ac/Ds系统及内源逆转座子Tos17外,近年来又发现了两个内源的活性转座子:来自MITE(Miniature Inverted-repeat Transposable Element)家族0.43kb长的mPing因子及来自hAT家族0.6kb长的nDart因子。mPing因子在组织培养、花药培养、射线及高静水压处理条件下被诱导转座;而nDart因子是一个非自主型转座子,其转座原理类似于Ac/Ds系统,在与自主型转座子aDart共存条件下完成转座,与aDart分离后突变稳定遗传,组织培养条件下不能诱导该转座子的转座活性,所以不会引起相应的无性系变异(Jiang et al. 2003, Kikuchi et al. 2003, Nakazaki et al. 2003, Lin et al. 2006, Maekawa et al. 1999, Tsugane et al. 2006, Takagi et al. 2007)。Ueguchi-Tanaka及Tsugane等已经利用nDart-启动基因标签系统获得了多个nDart插入突变体,并对其中一个赤霉素不敏感的矮秆突变体进行了研究,发现该突变相关基因编码一种水溶性赤霉素受体蛋白(Ueguchi-Tanaka et al. 2005, Tsugane et al. 2006)。随着相关研究的不断深入,我们相信水稻内源的转座子系统将成为新一代功能基因组研究的有利工具。

### 1.1.2 利用突变体鉴定、克隆基因

水稻各种类型诱变突变体库的构建和集中保存,为分子生物学和育种学研究提供了巨大的资源平台。基于已有突变体库的基础上,利用突变体克隆相关基因并研究其功能,对于揭示水稻重要农艺性状的分子机理、调控途径至关重要;而且一旦这些基因的功能明确,就可以采用生物技术的手段将其应用于品种改良,为解决我国21世纪的粮食问题,培育产量高、品质好、抗逆性强的优良品种提供新的途径。克隆突变基因的策略有很多,但在拟南芥和水稻中应用最为成功的是T-DNA标签法(T-DNA tagging)、图位克隆法(map-based cloning)和定向诱导基因组局部突变(Targeting Induced Local Lesion In Genome, TILLING)技术,下面对这三种方法作一介绍。

### 1.1.2.1 图位克隆

图位克隆 (map-based cloning) 又称定位克隆 (positional cloning), 1986年首先由剑桥大学的Alan Coulson提出 (Coulson et al. 1986), 用该方法分离基因是根据目的基因在染色体上的位置进行的, 无需预知基因的任何DNA序列及表达产物的有关信息。通过分析突变位点与已知分子标记的连锁关系来确定突变表型的遗传基础。近年来随着对水稻基因组测序工作的完成, 各种分子标记日趋丰富, 数据库不断完善, 在水稻中克隆一个基因需要付出的财力、物力、人力已大大减少。

图位克隆的基本实验程序 (图1-1) 为: 突变体植株和另外一种野生型水稻 (籼稻或粳稻) 杂交, 杂交亲本的选择原则为: 尽量选多态性高, 广亲和性, 有显性形态标记的品种;

播种F1代种子。本实验室利用籼稻龙特普做杂交父本, 一方面利用其广亲和性, 可以解决后代结实率低的问题, 另一方面有显性标记, 可以使杂种F1代在田间即可方便识别, 大大节省分子检测的工作量; F1代自交得到F2代种子, 按株系统统计F2群体中突变型个体与野生型个体的出现比率, 确定该突变性状由几对基因控制。在明确一对基因控制的前提下, 如果突变基因是隐性的, 选突变型个体作为定位群体, 如果突变基因是显性的, 用野生型植株作为定位群体; 对突变基因进行初定位, 首先用20株定位单株和均匀分布于水稻12条染色体的分子标记(相邻两个分子标记间的相距大约为20cM)将目的基因初步定位在某个染色体上; 精细定位目的基因, 利用更多的F2群体 (不足时也可用F3群体) 和新的分子标记将目的基因所在区间的范围逐步缩小, 直到缩小到40 Kb或者更小的区间为止。显然定位群体越大和目的基因附近可用分子标记越多, 就能更精确的克隆到目的基因; 利用生物信息学手段预测候选区间的功能基因, 对候选基因进行测序, 寻找突变基因; 利用过表达分析、互补实验和RNA干涉技术验证目的基因的功能(Jander et al. 2002, Meinke et al. 2003)。当然, 突变性状由几对基因控制时, 也可以利用图位克隆的方法来定位基因, 但是涉及基因越多, 定位的工作量越大。

在基因组全序列公布之前, 筛选与目的基因紧密连锁的分子标记是图位克隆的瓶颈。随着粳稻品种日本晴精细图谱以及籼稻品种9311全基因框架图的公布, 水稻全基因组范围内的各种分子标记日趋丰富 (Yu et al. 2002, IRGSP 2005)。到目前为止大约有2740个SSR标记 (simple sequence repeat) 已经构建到水稻的物理和遗传图谱上, 平均每157 kb 的区段就有一个SSR 分子标记 (Shen et al. 2004)。Shen等在日本晴和9311序列的基础上构建了全基因组范围的核苷酸多态数据库, 这个数据库包括了1,703,176个单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 和479,406个插入/缺失 (Insertion/Deletions, InDels) 多态, 这些多态大部分可以发展成为InDels、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)、dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequences)、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 和 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 等新的分子标记 (Shen et al. 2004)。这些发表的分子标记和多态为水稻功能基因的图位克隆提供了便利。

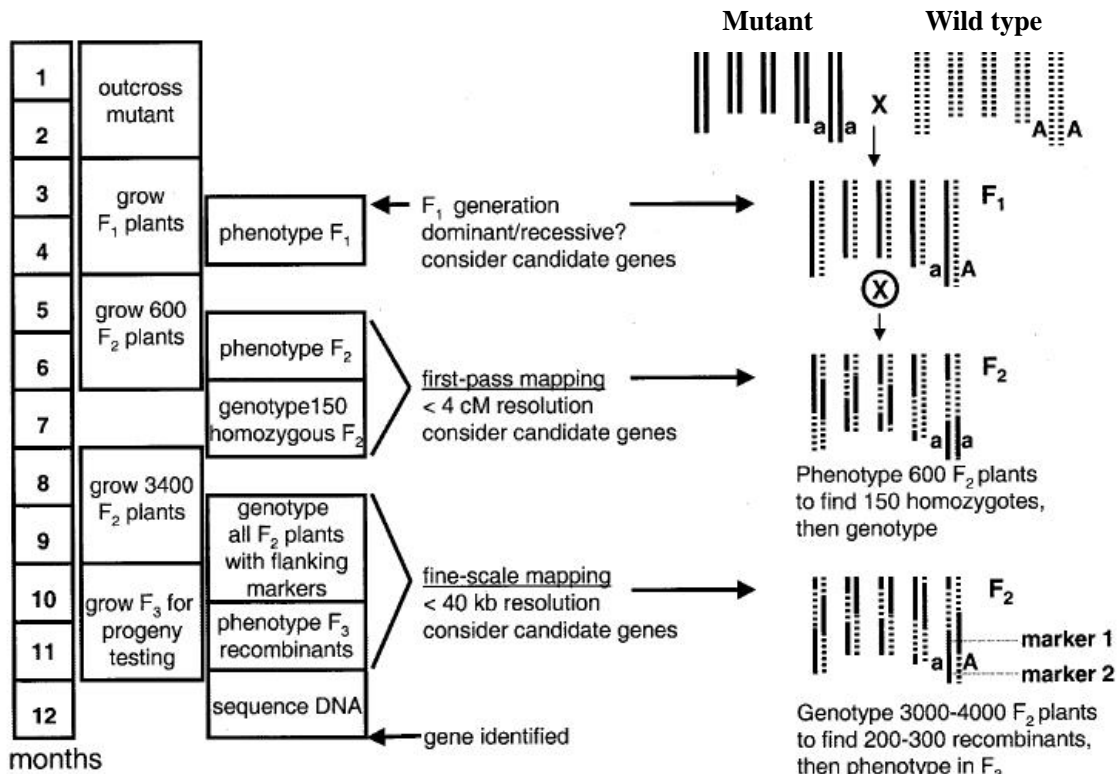


图 1-1 图位克隆的基本程序 (拟南芥) (引自 Jander et al. 2002)

Fig 1-1. Protocol of map-based cloning ( Arabidopsis thaliana)

图位克隆在图谱饱和的模式植物功能基因组研究中发挥了巨大的作用。拟南芥有37%的突变基因是通过图位克隆获得的 (Meinke et al. 2003)。在水稻中包括导致第一次绿色革命的半矮基因*SD1*、单穗基因*MOCL*、脆茎基因*BC1*、耐盐基因*SKC1*、雄性不育基因*Rfla*和*Rflb*等一系列重要农艺性状基因均是通过图位克隆法分离的(Sasaki et al. 2002a, Li et al. 2003a, Li et al. 2003b, Wang et al. 2006, Yang et al. 2007, Ichitani et al. 2007)。

### 1.1.2.2 T-DNA 或转座子标签法

自Hiei等首次报道用农杆菌介导法成功转化水稻以来,该方法被广泛应用于水稻遗传转化并不断完善,成为功能基因组研究中构建水稻插入突变体库的重要手段(Hiei et al. 1994)。T-DNA或转座子标签法是通过插入片段旁邻序列的获取来克隆功能基因的方法,因此只有那些由插入引起突变性状的突变体才能通过此方法分离突变基因。T-DNA或转座子标签法的基本程序为:建立插入的突变体库,从突变体库中筛选感兴趣的突变体,然后通过连锁分析确认该突变性状由插入引起,利用TAIL-PCR等技术分离插入位点的旁邻序列,生物信息学预测。通过花粉管导入法建立的T-DNA插入突变体库在拟南芥功能基因组研究中发挥了巨大的作用,拟南芥已克隆的突变基因有40%是通过T-DNA标签法获得的(Meinke et al. 2003)。在水稻上,虽然世界各国的研究机构不惜巨资构建了多达几十万株独立株系的水稻T-DNA插入突变体库(Hirohiko et al. 2004, An et al. 2005),然而到目前为止已报道的利用T-DNA标签法克隆的

水稻突变基因仅10多个。事实上，农杆菌介导转化的水稻T-DNA插入突变体库中的突变体，大部分突变性状不是由T-DNA插入引起的。Hirohiko等报道，在水稻T-DNA插入突变体中由T-DNA插入引起突变性状的比例少于5%，而大部分突变是由组织培养过程中，水稻内源的转座子被激活引起的(Hirohiko et al. 2004)。因此有必要建立更为精确的转基因技术，提高突变性状与T-DNA或转座子标签的共分离率，使组织培养诱导突变与T-DNA、转座子标签诱导突变各显其长，提高突变体在水稻功能基因组研究中的利用效率。

一旦确定突变性状是由T-DNA或转座子标签插入引起的，就可以通过分离插入位点的旁邻序列克隆功能基因。分离旁邻序列的方法主要有以下几种：TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) (Liu et al. 1995, Liu et al. 1995)、反向PCR(reverse PCR) (Ochman et al. 1988, Triglia et al. 1988)、质粒拯救(plasmid rescue) (Koncz et al. 1989)和AL-PCR(adaptor ligation PCR) (Rosenthal and Jones 1990)等。以上四种获得旁邻序列的方法各有优缺点，而其中TAIL-PCR以其简单快速的特点在获得插入位点的旁邻序列中运用最为广泛。到目前为止，通过T-DNA或转座子标签法已经克隆了多个水稻功能基因（见表1-1）：

表 1-1 水稻中 T-DNA 或转座子标签法克隆的基因

Table 1-1 Gene cloned by T-DNA tagging or transposon insertion

| 基因名称                       | 突变体表型               | 基因功能             | 标签      | 参考文献                  |
|----------------------------|---------------------|------------------|---------|-----------------------|
| Name                       | Phenotype of mutant | Function of gene | Tagging | Reference             |
| <i>OsCHLH</i>              | 淡绿叶                 | 镁离子螯合酶大亚基        | T-DNA   | Jung et al. 2003      |
| <i>OsGA20ox1</i>           | 半矮秆                 | 赤霉素20氧化酶         | T-DNA   | Oikawa et al 2004     |
| <i>OsP5CS2</i>             | 耐盐耐冷                | 脯氨酸合成酶           | T-DNA   | Hur et al. 2004       |
| <i>OsMADS50</i>            | 开花延迟                | 花器官发育相关蛋白        | T-DNA   | Lee et al. 2004a      |
| <i>OsCPI</i>               | 花粉发育异常              | 半胱氨酸蛋白酶          | T-DNA   | Lee et al. 2004b      |
| <i>Udt1</i>                | 绒毡层不发达              | 转录因子             | T-DNA   | Jung et al. 2005      |
| <i>lla</i>                 | 大叶角                 | 株型发育相关蛋白         | T-DNA   | 汪得凯等2005              |
| <i>OsCAO1</i>              | 淡绿叶                 | 叶绿素a加氧酶          | T-DNA   | Lee et al. 2005       |
| <i>OsGNA1</i>              | 短根                  | 6-磷酸葡萄糖胺         | T-DNA   | Jiang et al. 2005     |
| <i>OsGLU1</i>              | 矮秆                  | 1,4-AD-葡聚糖酶      | T-DNA   | Zhou et al. 2006      |
| <i>OsAT1</i>               | 斑点叶                 | 酰基转移酶            | T-DNA   | Mori et al. 2007      |
| <i>BFL1</i>                | 穗分化缺陷               | 花器官发育相关蛋白        | Ds      | Zhu et al. 2003       |
| <i>OsKS1</i>               | 矮秆                  | GA合成途径相关蛋白       | Ds      | Margis et al. 2005    |
| <i>DT1</i>                 | 双分蘖                 | 水稻类形成素蛋白         | Ds      | 孙丙耀等2007              |
| <i>OsH15</i>               | 短节间                 | kn1-型同源异型框       | Tos17   | Sato et al.1999       |
| <i>Osabal</i>              | 穗发芽                 | 玉米黄质环氧化酶同源       | Tos17   | Agrawal et al. 2001   |
| <i>OsTATC</i>              | 淡绿叶                 | 蛋白转运酶            | Tos17   | Agrawal et al. 2001   |
| <i>phyA</i>                | 水稻光形态特异性            | 植酸酶              | Tos17   | Takano et al. 2001    |
| <i>Ring finger protein</i> | 侧根伸长缺失              | 泛素化途径相关蛋白        | Tos17   | Lu et al. 2002        |
| <i>OsCesA7</i>             | 脆茎                  | 纤维素合成酶结合亚基       | Tos17   | Tanaka et al.2003     |
| <i>YABBY family</i>        | 披叶                  | 调节叶中脉形成相关蛋白      | Tos17   | Yamaguchi et al. 2004 |

### 1.1.2.3 TILLING

应用理化诱变常可以产生一些点突变或缺失突变，但常规方法难以检测到基因组中哪个位点发生了突变，2000年 McCallum 等建立了一个用于大规模筛选点突变的方法——TILLING ( Targeting Induced Local Lesion In Genome ) 技术，并用该方法成功的筛选出了DNA甲基化酶突变基因*CMT1*和*CMT2*，建立了拥有10,000个突变体的大规模TILLING筛选体系 ( McCallum et al. 2000a , McCallum et al. 2000b )。其基本原理是通过理化诱变方法产生一系列的点突变，设计引物，通过PCR扩增感兴趣的区段，经过变性复性过程使野生型DNA分子和突变DNA分子产生异源双链DNA分子，再利用特异性识别异源双链中错配碱基的核酸酶切开错配处的DNA，最后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和双色红外荧光检测技术进行分析。随着TILLING方法有效应用到越来越多的生物种类，如拟南芥、水稻、玉米、线虫、果蝇和斑马鱼等，它在遗传学研究中的重要价值也越发体现出来( Colbert et al. 2001 ,Henikoff et al. 2004 )。

应用TILLING技术克隆的基因步骤是： 利用理化诱变的方法 ( EMS、伽玛射线、快中子等 ) 诱发点突变，构建突变体库； 提取突变后代个体DNA并根据实际情况混合DNA建立DNA池 ( pool )，通常用96孔板形成DNA混合池，每孔最多8个，每块板可以检测768个突变个体； 根据已知的目标基因序列设计特异引物扩增出感兴趣的基因片段； 所扩增PCR产物经变性、退火后形成异源双链核酸分子，并用特异性识别异源双链错配碱基的核酸酶 ( 通常为CEL I ) 剪切错配处的DNA； 利用检测工具 ( 变性高压液相色谱仪和红外双色荧光检测系统 ) 检测异源双链核酸分子，获得突变池； 利用相同方法从突变池中筛选突变个体； 突变个体PCR产物的测序鉴定。目前，在拟南芥中该系统已完全自动化，可以进行大规模的筛选突变体( Colbert et al. 2001 )。水稻中该技术也在成功应用，Leung 等已获得14,000个EMS突变群体，并利用TILLING技术进行靶向突变体的筛选 ( Leung et al. 2002 )。

## 1.2 从基因到表型 反向遗传学研究

随着各种模式生物基因组测序的完成，海量的基因序列信息呈现在生物学家面前，而另一方面从表型到基因的研究面临着突变性状遗传背景复杂，基因克隆费时费力等困难。因此，着眼于定点修饰基因，从序列到蛋白的反向遗传学研究越来越显示了其高通量，大规模的技术优势。该策略是通过使特定基因发生定向突变、缺失、失活和敲除后研究其的表型变异来推测在生物体内基因的作用，主要的研究方法有RNA介导的基因沉默 ( RNA silencing )、T-DNA或转座子标签技术、异位表达等 ( Ectopic expression )。

### 1.2.1 RNA介导的基因沉默

RNA沉默 ( RNA silencing ) 是生物抵抗异常DNA ( 病毒、转座因子和某些高重复的基因组序列 ) 的保护机制，同时在生物发育过程中扮演着基因表达调控的角色，它可以通过降解RNA、抑制翻译或修饰染色体等方式发挥作用。其发现可追溯到1990年，Napoli等向矮牵牛中导入更多拷贝与粉红色色素合成有关的基因以产生颜色更深的紫色矮牵牛花，结果许多花

朵的颜色不但没有加深,反而变成白色或花白色。因为导入的基因和其同源的内源基因同时都被抑制,所以被称为共抑制(co-suppression)现象。另外,这种共抑制现象被确认是发生在转录后水平,所以又被称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。随后发现在真菌中的消除(quelling)现象以及动物的RNA干扰(RNA interference, RNAi)现象都属于RNA沉默。RNA沉默存在两种既有联系又有区别的途径:siRNA(small interference RNA)途径和miRNA(microRNA)途径。siRNA途径是由dsRNA(double-stranded RNA)引发的,dsRNA被一种RNaseIII家族的内切核酸酶(RNA-induced silencing complex, Dicer)切割成21-26nt长的siRNA,通过siRNA指导形成RISC蛋白复合物(RNA-induced silencing complex)降解与siRNA序列互补的mRNA而引发RNA沉默。而miRNA途径中miRNA是含量丰富的不编码小RNA(21~24个核苷酸),由Dicer酶切割内源性表达的短发夹结构RNA(hairpin RNA, hpRNA)形成。miRNA同样可以与蛋白因子形成RISC蛋白复合物,可以结合并切割特异的mRNA而引发RNA沉默。尽管引发沉默的来源不同,但siRNA和miRNA都参与形成结构相似的RISC,在作用方式上二者有很大的相似性。根据它们作用的特点,可通过将人工设计获得的双链RNA,转入到生物体内可用于基因功能研究,农作物品种的改良和基因治疗等。

(1) 基因功能的研究。以35S或ubi作为启动子,将目标基因的5'或3'端的UTR的一段DNA以反向重复的方式连接在一无关序列的两侧,加上终止子后,导入到植物体后,可以导致目标基因的降解,从而通过观察目标基因在表达量减少的情况下的性状变化,获知该基因的功能。

(2) 农作物品种的改良。根据RNA干涉高效、可稳定遗传的特点,可将RNA干涉应用于改良农产品的品质。水稻突变株系*Jgc-1*(Low Glutelin Content-1)是第一个应用RNA干涉技术产生的品种,该品种具有低蛋白含量的特性,适用于限制蛋白摄入量肾病人(Kusaba 2004)。

(3) 基因治疗。理论上针对有害基因序列设计RNA干涉载体,导入到人体后可以引发该有害基因转录本的降解,从而达到抑制有害基因表达的目的。

### 1.2.2 T-DNA或转座子标签技术

插入诱变往往是以基因敲除(knockout)的方式导致突变。在现已研究清楚的遗传性状中,多数是通过基因敲除后引起功能缺失得到的,但有些基因家族的单个成员仅在特定的生理状态下才能表现功能;另一方面,植物基因组大部分基因以冗余形式存在,当这些基因中的其中一个破坏时,其它的基因会补偿其功能。因此,大量T-DNA、转座子标签法获得的敲除突变体没有可见的表型改变,难以对这些基因进行研究。为了弥补不足,科学家在构建插入突变体库时引进了新的技术即激活标签(Activation Tagging)和基因陷阱(gene trap)。激活标签是在T-DNA的边界序列插入一个或多个增强子、强启动子或特异表达启动子,当这些增强子或启动子插入到某个基因时可以增强或诱导其表达,从而得到功能获得的显性突变体(Tani et al. 2004, An et al. 2005)。目前韩国、中国台湾和欧盟等国家和地区构建了激活标签的水稻突变体库,并获得了一些激活标签导致的突变体(Jeong et al. 2002, An et al. 2005, Mori et al. 2007)。

基因陷阱可分为三种类型：增强子陷阱，启动子陷阱和基因陷阱。它们以报告基因的表达来发现突变基因，并不完全依赖突变体的表型。该技术有利于多效性基因和多基因家族的基因识别。基因陷阱根据其转座子中报告基因的结构和所插入的基因组位置的差异而有不同的称谓。如果转座子带有一个弱启动子报告基因，只有插入到增强子附近才能表达的则称为增强子陷阱(enhancer trap)。如果转座子中含有一个没有启动子的报告基因，报告基因只有以正确的方向插入到转录单位的exon中才能表达，并产生一个融合转录物，这类结构被称为启动子陷阱(promotor trap)。如果转座子中的报告基因前含有一个或几个剪接受体( splice acceptor sequence )序列，当含有该结构的转座子插入到基因组的intron中后，通过转录后加工，则可产生一个上游exon和报告基因的融合产物，这类结构被称为基因陷阱(gene trap)。由于转录物的融合，启动子陷阱和基因陷阱所产生的插入，也能产生被插入位点前的DNA序列所产生的多肽与报告基因的融合蛋白，这一特点，可以提供蛋白质在细胞中定位信息。这种基因陷阱方法可在杂种后代中产生大量的插入突变，为大通量基因功能分析提供了实验材料，成为功能基因组分析中研究者所青睐的方法。

### 1.2.3 异位表达

异位表达 (Ectopic Expression) 是利用可诱导性的启动子，通过外加物质的诱导作用增强转基因表达的一种方法。在自然界的生物中普遍存在着一种热激系统，在高温条件下能够迅速表达。在目的基因上游连接一个热激蛋白的启动子序列然后转入生物体内，用小的激光束短时间处理任意组织器官甚至是单个细胞，就可以使目的基因在该处表达(韩斌，2005)。Sentoku等在水稻中克隆了一个主要在胚发生时期和小花发育时期表达的基因*OsMADS22*并把该基因与玉米泛素启动子构建于载体中进行异位表达，结果在转基因植株中表现出异常发育的花形态 (Sentoku et al. 2005)。Hu 等利用杂交杨*Pttkn1*基因在矮牵牛中的异位表达导致了转基因植物在叶、花和整体形态方面的多种改变，包括花冠正面异位刺状结构的形成，花冠背面异位花瓣的形成，花器官的融合，花冠中脉的缩短，花冠背面沿中脉瘤状物的形成，花冠边缘锯齿形缺刻的形成以及花冠颜色的改变 (Hu et al. 2005)。

## 2 基因表达产物及其功能分析

基因功能的研究可以通过以下几个途径：DNA水平研究，如功能互补、过表达载体的构建转化等，研究目的基因与表型性状间的关系；转录水平分析，如Northern blotting、RT-PCR及基因芯片 (gene chip) 等技术，探究基因的时空表达模式，确定其在发育途径中的功能；蛋白水平的检测，如酵母双杂交体系、双向电泳、蛋白质阵列及免疫反应等，研究蛋白功能及与其它蛋白的互作关系，进而揭示某个生长发育途径的详细作用机理。

### 2.1 功能互补及过表达分析

功能互补实验是通过构建载体将野生型的目的基因包括其自有启动子、终止子序列以及

调控元件转化突变体，从而观察突变体表型是否恢复正常或发生预期的表型变化，是一种最直接，最有效验证基因功能的方法。用组成型强启动子启动野生型目的基因在野生型亲本及突变体中表达，然后根据表型的变化可以研究基因的表达模式，目的基因在野生型和突变体中超表达，出现非预期的表型变化将为基因功能及其相关途径的研究提供线索。Zhou等利用T-DNA插入法克隆了一个水稻矮秆相关突变基因*OsGLUI*，编码内源的膜结合1,4- $\beta$ -D-葡聚糖酶，功能互补结果显示突变体可恢复到野生型表型。突变体转化过表达载体后得到了与突变体相似的表型，但株高略有增加，结合RNAi结果说明*OsGLUI*基因在控制植株节间延伸过程中起主要作用（Zhou et al. 2006）。

## 2.2 转录水平分析

### 2.2.1 Northern blotting 和 RT-PCR 分析

Northern blotting是Alwine等建立起来的一种用DNA探针特异检测RNA的方法（Alwine et al. 1977）。它可用于定性、定量检测特异的mRNA，分析目的基因的表达情况。但是其检测效率及灵敏度较低，最主要的缺点是需要用放射性物质标记探针，对人及环境危害较大。1998年Peterhaensel等提出用地高辛、荧光素或生物素替代放射性物质，减小了这一方法的使用局限性（Peterhaensel et al. 1998）。PCR技术不仅可以用来扩增DNA模板，也可以用来扩增被逆转录成cDNA形式的特异的RNA序列即RT-PCR（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）。利用RT-PCR技术分析基因表达水平时，PCR扩增前需用DNase消化，同时引物的设计也应该跨越一个或多个内含子，这样可以减少DNA扩增对实验结果的影响。RT-PCR法以其比Northern blotting更加灵敏，需要的RNA量及序列信息少，不涉及放射性物质等优势在基因功能研究中被广泛使用。

### 2.2.2 基因芯片

基因芯片是利用核酸分子杂交的原理，用已知序列的核酸探针，对未知的核酸序列进行杂交检测。利用微点阵技术将寡核苷酸cDNA或基因组DNA固定排列在固相支持物表面，形成高密度的寡核苷酸阵列，然后与标记的生物样品进行杂交，通过特殊的检测系统对每个杂交点进行定量分析。用于分析DNA突变及多态性、发现新基因、监测同一组织细胞在不同状态下或在同一状态下不同组织目的基因表达水平的差异，从而明确目的基因及其互作元件在植物生长发育途径中的作用等。它的优点在于：高通量。基因芯片可以同时大量基因（例如：某一组织细胞特异状态或同一条件多个组织的目的基因及其互作元件）的表达情况进行分析；信息量大。可使用几种不同颜色的荧光染料标记探针，这样在同一张阵列膜上进行一次杂交试验就可以同时分析不同细胞间或不同环境下基因表达的差异。Li等利用Tiling微列阵技术分别在籼稻和粳稻中鉴定了27744和25352个未注释为基因外显子的转录活性区域（transcriptionally active regions, TARs），粳稻中约80%的非外显子TARs可被注释为基因功能区或基因组结构元件，例如，抗敏转录本、基因复制片断、可能的非编码RNA等（Li



et al. 2007)。在水稻花粉发育研究中,利用cDNA微阵列技术找到了253个参与调控该途径的cDNA,逆境处理结果显示其中53.8% (136/253)的cDNA与细胞脱水有关而21% (57/253)与细胞损伤相关 (Han et al. 2007)。

然而,基因芯片技术也有某些缺陷包括: ,灵敏度低。特别是对于一些低丰度的材料,基因芯片检测技术的灵敏度仍不够,可进一步通过对样品进行PCR或RT-PCR扩增以提高检测灵敏度; ,特异性低。杂交时芯片上的探针自身形成二级甚至三级结构,使靶序列不易被探测到,目前研究用肽核酸(PNA)取代DNA以解决这一问题; ,DNA芯片成本很高,需要机器点膜和特殊的信号检测分析系统(钱前,程式华 2006)。

## 2.3 蛋白质组研究

蛋白质组学(Proteomics)是在基因组学的研究成就和高通量的蛋白质分析技术得到突破的背景下产生的新兴研究领域。蛋白质是基因功能的体现者和执行者。现在已经证明,一个基因不只产生一个编码产物,机体所处的不同环境和本身的生理状态差异,会导致基因转录产物通过不同的剪切修饰方式,转译编码不同的产物。蛋白前体加工修饰和转移定位后,才具有活性和生物功能,产生相应的生理作用,适应生存环境。在转录水平上所获取的基因表达信息并不足以揭示该基因在细胞内的确切功能。直接对蛋白质的表达模式和生物学功能进行研究就成为生命科学发展的必然趋势。因此,研究基因组编码的全蛋白质功能及其相互作用关系的蛋白质组学应运而生(Anderson & Anderson, 1998)。蛋白质组学研究方法有很多,并且不断发展和出现新的技术。目前主要有以下几种:

### 2.3.1 酵母双杂交体系 (Yeast two-hybrid system)

酵母双杂交系统是研究蛋白互作的有力工具,现已被广泛应用于真核基因的表达与调控、信号转导通路、细胞周期与分化、反式因子的鉴定与分离等多领域的研究。其理论基础是真核生物转录因子结构模型。研究表明,许多真核生物的转录因子都是由两个结构分开、功能独立的结构域组成。当转录因子的DNA结合域(DNA-binding domain, DNA-BD)与激活域(DNA transcriptional activation domain, DNA-AD)紧密结合以后,就会启动基因转录。许多转录因子的DNA-BD均可被用于酵母双杂交系统,最常用的是酿酒酵母半乳糖苷酶转录因子GAL4和大肠杆菌阻遏蛋白LexA的DNA-BD。利用包含DNA-BD与DNA-AD的特异载体,将开放阅读框架(ORF)分别连在这两种载体上,构成文库,然后转入酵母细胞。当其中的两个ORF编码蛋白在酵母细胞中表达,并发生相互作用时,就会将DNA-BD与DNA-AD结合在一起,从而导致报告基因转录。通过培养基营养缺陷筛选法,可将没发生相互作用的酵母克隆筛选掉,而将发生相互作用的酵母克隆保留下来。然后对发生相互作用的蛋白质进行分析,通过测序就可以鉴定ORF。因此,酵母双杂交系统对大规模筛选分析蛋白质间的相互作用来说是一项简便易行的方法。但是利用酵母双杂交系统所得到的研究结果仅仅是潜在的蛋白质间的相互作用,还需要进一步的生物学实验验证或者排除。Vidal和Endoh对酵母双杂交系统的改进,叫做 反向 双杂交,它可被用来鉴定破坏蛋白质间相互作用的复合物和肽链(Vidal and

Endoh 1999)。

### 2.3.2 双向电泳 ( 2DE) 和质谱技术 ( Mass-spectrometric)

2DE方法的应用始于20世纪70年代,但直至今日,仍然是分离蛋白质的有效方法。与基因组研究不同的是,蛋白质组学并没有类似于PCR反应的扩增方法,因此,分离样品的精确性就成了至关重要的问题。双向凝胶电泳首先利用等电点和蛋白分子量的不同分离蛋白,然后借助于考马斯亮蓝或银染法,对蛋白质进行定性、定量分析;应用荧光染料,还可以使一定范围内的上千种蛋白质定量地显现出来,大大提高了2DE的精确性。当然2DE技术还远远没有达到完善的地步,例如要使低水平表达的蛋白质显现出来仍有困难,而高水平表达的蛋白质有时也会出现小部分的模糊。质谱(Mass-spectrometric)技术的发展,使分离和鉴定蛋白质的工作又大大前进了一步。以往进行的双向凝胶电泳从提取液中分离并显现蛋白,然后回收有差异的斑点,进行测序鉴定。现在可以用分子扫描仪同步消化转移感兴趣的斑点到PVDF膜上,然后进行质谱分析鉴定所获蛋白。例如,在比较突变系和野生型差异以获得功能蛋白的实验中,用同位素亲和标签标记蛋白,再结合质谱分析,就可以直接定量比较蛋白质丰度的差异 ( Han et al. 2001 ), 是一种测定基因表达变化的有效方法。

### 2.3.3 蛋白质芯片 (Protein chips)技术

蛋白质芯片(Protein chips)是一类高通量、微型化分析蛋白质表达及功能的新型分离及鉴定技术 ( Lueking et al. 2005 )。可分为生物化学芯片、化学芯片和缩微芯片三类。生物化学芯片与基因芯片的原理相似,芯片上固定的是结合特异蛋白质的分子如抗体、抗原、配体、受体及酶等,形成蛋白质的微阵列,依据蛋白分子间、蛋白与核酸、蛋白与其他分子相互作用实现检测目的。实验时将待检样品中的蛋白质用荧光素、同位素或酶分子标记,在适当的条件下与芯片作用,结合到芯片上的靶蛋白就会直接或间接通过底物发出特定信号(荧光、放射线或颜色),然后用激光共聚焦扫描仪、荧光透射扫描仪或质谱仪等对信号进行检测。化学芯片的设计基于传统色谱原理,在芯片表面包裹各种色谱介质,通过色谱介质的疏水力、静电力、金属螯合、共价结合等捕获样本中的目标蛋白,经特定的洗脱液去除杂质后,再用质谱进行检测保留在芯片上的蛋白,获得样品蛋白质表达谱。缩微芯片又称芯片实验室(Lab-on a chip) ( Brivio et al. 2006 )。利用玻片或硅片上制作各种高信息量的芯片,使蛋白质的分离、纯化、酶解、分析等步骤集中在一块玻片上进行,是蛋白质芯片技术的发展趋向。蛋白质芯片能够同时分析上千种蛋白质的变化情况,使得在基因组水平研究蛋白质的功能(如酶活性、抗体的特异性、配体-受体交互作用以及蛋白质与蛋白质或核酸或小分子的结合)成为可能。

大规模的蛋白质组研究在标准且可重复的2DE蛋白质分析方法基础上,再加上其它技术的辅助(如蛋白质免疫检测、微序列分析、质谱等),可以使我们获得大量的蛋白质表达的信息。这些信息可以贮存在蛋白质数据库中,并与其它数据库相联接。互联网提供的植物蛋白质组数据库有:

<http://psort.nibb.ac.jp/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=proteinclusters>

[http://www.international.inra.fr/research/scientific\\_resources/scientific\\_databases](http://www.international.inra.fr/research/scientific_resources/scientific_databases)

数据库集中在模式植物拟南芥，重要的粮食作物水稻、玉米，以及松树等植物上，这些数据库都提供可以点击的2DE图像，还包括植物各器官(根、茎、叶、芽、种子)、各组织(愈伤组织、木质部、韧皮部)或基因型间多肽形式的比较。蛋白质组数据库的一个重要特征是它们建立了与基因组计划的联系。现有的蛋白质组数据库所包含的植物都是已完成或正在进行系统测序的物种。有的是在基因组水平(如拟南芥、水稻)，有的是在转录组水平(如拟南芥、玉米、水稻、松树的表达序列标签EST)。更有意义的是在拟南芥原生质膜蛋白质数据库中发现许多蛋白质与未知的EST相关联，这为研究在亚细胞水平表达的蛋白质的编码基因提供了重要信息。

## 第二章 水稻组培诱导突变

体细胞无性系变异(somaclonal variation)是指由任何形式的植物组织培养中产生的变异(Larkin and Scowcroft, 1981)。对各种植物体细胞无性系变异株后代的分析证明,其绝大多数变异是可遗传的,组织细胞培养过程引起的无性系变异,对植物品种改良和选育新品种具有重要的意义;但是如果目标是农艺性状不变(如快繁)或者仅仅改变目的性状(如转基因),则希望最大限度的限制无性系变异(Sun et al. 1991)。近年来在遗传转化实践中表明,经历组织培养和再生阶段后,常表现出一些非目的性状改变,其原因属体细胞无性系变异还是外源基因的插入诱变,往往很难确定(Veilleux 1998)。因此,体细胞无性系变异一直为众多研究者所关注。水稻是世界上最重要粮食作物之一,其体细胞无性系变异研究也取得了较大进展。

### 1. 体细胞无性系变异的突变类型

水稻组织培养过程中会产生广泛的变异,在株高、株型、叶形以及抗病、米质、耐逆境、花粉育性、光合特性、配合力、胚致死型、生根能力及抽穗期等方面都会发生突变。Oono首次报道了栽培水稻体细胞无性系的性状变异,在种子愈伤组织再生的1121个无性系中,发现有株高、小穗育性、抽穗性、叶片形态和叶绿体缺失等表型变异(Oono 1978)。Sun等以幼穗和成熟胚为材料研究籼稻和粳稻体细胞无性系变异,在4个品种的950个R<sub>2</sub>代株系中,有75.6%的株系出现变异,单个性状变异频率从11.5%-39.5%不等(Sun et al. 1983)。中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室,先后以中花11和日本晴为受体,用T-DNA插入法获得了45000多个独立的水稻转基因株系,分离了一千多个性状可见的突变体,突变体库中包括了致死、叶色、株型、育性、熟期、穗型、早衰等类型的突变体(朱正歌等 2001),但后期研究发现其中T-DNA插入引起的突变不到10%,90%以上的突变来自于组培过程中的诱导变异。这些变异的研究不仅为水稻种质创新展现了广阔前景,而且也为功能基因组学提供了丰富的资源平台。

### 2 体细胞无性系变异的遗传

组织培养产生的变异十分丰富,从不同角度有多种分类方式。如依据变异性状在后代是否稳定遗传可分为可遗传变异和非遗传变异(外遗传或生理遗传)两类。对于可遗传变异,又可根据无性系变异在R<sub>2</sub>代是否分离而分为纯合变异(homozygous variation)和杂合变异(heteozygous variation)。纯合变异在R<sub>2</sub>代及以后世代均不出现分离,而杂合变异在R<sub>2</sub>代出现分离,但一般在以后世代可以稳定传递。据变异性状的基因作用对数可分为单基因、双基因和多基因变异。亦可据基因的显、隐性将无性系变异分为显性突变和隐性突变。除了核基因

突变外,细胞质基因也可能发生突变,如Yoshida等(1998)在Nipponbare的花培后代中获得两个高秆突变体B42-3及B42-48, B42-3与原亲本正反交F1均为高秆。而B42-48则不同,当以B42-48为母本时, F1为高秆, 为父本时则F1的株高与原亲本相同, 说明具有细胞质效应(Yoshida et al. 1998)。单基因或两对基因突变的事例比较普遍。当然, 也有多基因突变, 这些变异一般均符合经典的孟德尔遗传规律。Xie等(1995)在研究Lemont(绿颖壳GH)的体细胞突变体SC86-20973(紫红颖壳PRH)过程中发现, 正反交F1代均表现紫红颖壳, 说明该性状突变显性突变, 但正反交F2代中GH:PRH分别为147:37及180:42, 出现显性基因隐性化的特点(Xie et al. 1995)。这种现象的机理尚不清楚, 推测可能是隐性等位基因的产物阻碍了显性基因蛋白质的正常功能。

### 3 体细胞无性系变异的影响因素

体细胞无性系变异的发生受多种因素影响, 主要有以下几个因素: 外植体: 不同外植体对水稻体细胞无性系变异的影响差别非常明显, 水稻的变异率高低依次为幼穗>未成熟胚>成熟胚; 品种基因型: 研究表明, 不同基因型体细胞无性系变异的频率不同, 有些品种容易发生变异, 而有的则不易发生变异, 基因型被认为是影响变异的主要因素。如朱秀英等(1990)对20个基因型水稻的成熟或未成熟胚无性系变异后代研究发现, 808的无性系变异率高, 而金早4号最低(朱秀英等 1990); 植物生长调节剂水平: 2, 4-D是诱导胚型愈伤组织不可缺少的植物生长调节剂, 但同时也是引起无性系变异的主要物质。一般认为, 2, 4-D含量高的培养基再生植株比含量低的更容易发生无性系变异(Larkin et al. 1981); 性状: 已有资料表明, 一些性状易发生变异, 如株高(赵成章等 1982; Yoshida et al. 1998)、不育(Oono 1978; 凌定厚等 1990)等; 而另一些性状则不易发生变异, 具有较高保守性, 如广亲和性(孙立华等 1994)和恢复性(Shen et al, 1995)等; 继代及培养时间: 愈伤组织的继代及培养时间的长短, 既影响分化, 也影响性状的变异率。一般来说, 愈伤组织继代次数越多, 培养时间越长, 其绿苗分化率越低, 性状变异也越大。Yoshida等在花药培养研究中发现, 继代时间延长, 再生植株中二倍体植株的比例增加。同时发现, 随着继代时间延长, 无性系后代在株高、抽穗期、穗长、穗重、穗数和子粒重6个性状的变异率增加, 继代20周的无性系变异率为88%, 而继代4~6周的无性系变异率为63%(Yoshida et al. 1998); 培养条件和方式: 不同培养方式, 体细胞无性系变异发生的频率可能不同。

### 4 体细胞无性系变异的分子机理

关于体细胞无性系变异的研究在20世纪80年代初曾经出现一个高潮, Larkin和Scowcroft对无性系变异做了详尽和全面的分析(Larkin and Scowcroft 1981), 90年代以来, 随着分子生物学的迅速发展, 使无性系变异的机理研究由细胞水平的观测逐步向分子水平的研究深入。体细胞无性系变异中, 分子水平的变异涉及点突变、碱基修饰、DNA插入和缺失、染色体重排及转座子激活等。在水稻体细胞无性系变异中, DNA的插入、缺失、点突变及转座子激活

是最常见的(程式华和李建 2007)。

#### 4.1 基因突变

基因突变被认为是引起水稻体细胞无性系变异的重要来源。关于组织培养、理化诱导、逆境等情况下引起的基因突变已有很多报道。陈受宜等(1991)通过对耐盐突变体进行RFLP分析,确定了突变体在第7对染色体上两个连锁位点RG711和RG4发生了突变(陈受宜等 1991)。基因点突变并不一定全发生在变异性状的基因内,有时也可能是由于调控基因发生点突变,而导致目的基因遗传状态发生变化(Xie et al. 1995)。在本实验室的T-DNA插入突变体库中找到了多个组织培养引起基因突变的突变体,基因克隆后测序结果表明,有多种突变方式:包括缺失突变、插入突变、点突变,大片段倒位等(内部资料)。

#### 4.2 逆转录转座子激活

虽然已有实验结果表明,转座子激活可以引起植物体细胞无性系变异,如玉米Ac / Ds Spm/dSpm和水稻中Ping/Pong等频繁活动的转座子,但在水稻基因组中研究较多的是另一类型转座子-逆转录转座子(Retrotransposom)。与转座子不同的是,逆转录转座子转座是以RNA为中介,即以DNA RNA DNA方式转座,引起稳定变异。目前,在水稻中已经鉴定出32个逆转录转座子家族,其中研究较为深入的是Tos17,其长度为4.3kb。一般情况下,Tos17没有活性,但在逆境、辐射以及组织培养过程中,逆转录转座子被激活,发生转座,从而使水稻体细胞产生无性系变异(Hirochika et al. 1996)。Oono等利用72个分布于水稻12条染色体的探针,以限制性内切酶Hind Ⅲ酶切,对培养3个月和7个月的秋光愈伤组织再生植株进行分析,有2个标记GN232(位于第3染色体上)和GN89-2(位于第10染色体上)可以揭示多态性。以GN89-2为探针分析时发现,对照出现7.1kb和3.4kb两条带,而无性系后代R0C-22、R0E-20等出现11.4 kb、7.1kb和3.4kb三条带。同时发现,R0C-22、R0E-20等的自交一代R1C-22、R1E-20等的杂交图谱分成7.1 kb+3.4b、11.4kb+7.1 kb+3.4 kb和11.4 kb+3.4 kb三种类型,且符合1 : 2 : 1的比例,说明是杂合变异。用Tos17为探针,对R0C-22、R0E-20及其后代进行分析,发现11.4kb带的分离与以GN89-2为探针分析时相同。由于11.4 kb正好等于Tos17的长度(4.3 kb)和一条对照带的长度(7.1kb)之和,说明R0C-22、R0E-20等变异可能是由于Tos17插入到秋光的7.1 kb而引起(Oono et al. 1999)。本研究中涉及的一个突变体,也是由Tos17反向插入功能基因外显子所引起的突变。可以用逆转录转座子插入来解释体细胞无性系变异的一些现象,如随着组织培养时间延长,体细胞变异频率增加,这可能是由于长时间培养引起逆转录转座子拷贝数增加所致。一些体细胞无性系变异(如耐盐突变体)不稳定,其原因可能是由于逆转录转座子增强和启动子失活引起。总之,体细胞无性系变异研究还不够深入,对其机理研究尚处于初级阶段。但有理由相信,随着分子生物学发展和培养条件完善,将会为研究体细胞无性系变异提供更有力的工具和更丰富的资料,全面了解其发生的分子机制已为期不远。

## 第三章 水稻着丝粒 DNA序列研究及基因注释

着丝粒(centromere)是染色体稳定存在,并且正常分裂、分离到子细胞中的基本结构、功能元件之一。它负责有丝分裂和减数分裂过程的两个关键功能:(1)作为姊妹染色单体粘附位点和分离的调节位点;(2)作为着丝点(kinetochore)的形成中心,纺锤体微管通过着丝点与染色体相连,使染色体在早中期集合到赤道板,在后期分开移向两极。着丝粒的这些功能在所有真核生物都是高度保守的,但与着丝粒关联的DNA却没有保守性,不同的生物具有显著不同的着丝粒DNA序列。这一不可思议的现象促使人们寻找着丝粒可能的共同结构,并首先聚焦在与着丝粒相关联的DNA序列上。对酵母、线虫、果蝇和人类等模式生物着丝粒DNA较为充分的研究表明,它们的着丝粒DNA序列存在很大的差异,不存在对真核生物着丝粒功能高度专一的DNA保守序列(Henikoff et al. 2001, Sullivan et al. 2001)。对许多植物着丝粒的分析表明,与人类和果蝇等多细胞真核生物类似,植物的着丝粒也是包埋在若干百万碱基对长的高度重复DNA序列中。水稻基因组框架图和全长序列的精确测定虽已基本完成,但片段之间或重叠群之间仍存在一些缺口或空隙,尤其是着丝粒区间的序列,由于其高度重复性及序列同源性,给序列的测定、拼接及精细遗传图谱的构建带来了困难,到目前为止只有3条染色体(chr.3, 4, 8)的着丝粒序列被精确测定,并进行了相应的功能注释(Ma and Jackson 2006, Yan and Jiang 2007)。

### 1 水稻着丝粒区间序列研究

虽然水稻与其他真核生物如拟南芥、玉米、果蝇和人类等在着丝粒序列上没有保守性,但在水稻不同染色体之间,着丝粒序列中却包含两种同源度很高的大量重复的序列:155bp的卫星重复序列CentO和着丝粒特有的逆转座子(centromere-specific retrotransposon CRR),不同染色体之间只是重复次数、排列方式不同而已。栽培稻的CentO有155 bp和164 bp两个不同的亚族,以前者为主,后者是前者插入单一的10bp的结果;在每一亚族中又有许多变异类型,这些变异是单一碱基的替换、插入或缺失,很少有绝对保守的碱基;另外,相同的变异类型分布广泛,没有单一的相同单体的串联(Dong et al. 1998, Lee et al. 2005)。人类X染色体着丝粒的功能区含有高度均质化的~171bp -卫星重复序列,缺乏转座子插入,其侧翼区则含有分歧的 -卫星重复序列和明显较多的转座子(Schueler et al. 2001)。水稻着丝粒的DNA组成则有所不同,其功能区含有着丝粒专一的逆转录转座子CRR,它在着丝粒DNA中的重复度非常高,而且通常都是与CentO混杂在一起,构成了高度复杂的着丝粒序列性(Yan et al. 2007)。Cheng等(2002)研究表明CentO的重复度在水稻12条染色体中变化非常大,可以以此来区分各染色体,同时他们认为,CentO序列及其重复度在着丝粒功能保守性上起主要作用。

水稻12条染色体着丝粒在遗传图谱上的位置最早是由Singh等利用RFLP分子标记推断出来的(Singh et al. 1996),随后Harushima等又发展了更多的RFLP分子标记,使其位置精确化

(Harushima et al. 1998)。着丝粒DNA的一个特点就是重组交换率非常低，导致大量的分子标记与重组抑制区 (recombination-suppression domain, RSD) 共分离，无法绘制非常精细的遗传图谱。据报道第3和第8染色体中RSD的长度分别为3113 kb和2312 kb，着丝粒组蛋白H3结合域 (CENH3) 均嵌于其中 (Yan et al. 2005, 2006) (图3-1)。一直以来人们都认为着丝粒DNA是一段高度异质化的序列，没有功能基因，但是第8染色体上功能基因的发现，使人们不得不重新认识这一段神秘的序列。通过利用水稻EST序列和着丝粒特异卫星序列构建酵母人工染色体跨叠克隆群，进行染色体作图，Wu等 (2004) 认为，第8染色体上着丝粒区间大约有2Mb，位于遗传图谱54.3 cM处。Nagaki等 (2004) 在对1.65 Mb的序列分析后发现，在此区间内存在有47个假设的基因，其中14个存在于着丝粒的异染色质区，而在这14个基因中至少有4个是功能基因。此后，Yan等 (2006) 利用荧光原位杂交 (FISH) 技术研究第3染色体发现，在着丝粒DNA区间约有3113kb序列表现低重组率，其间包含着1881kb的CENH3结合域，有19个可转录基因 (表3-1)，CentO的重复全长可达441kb。利用大规模平行测序技术 (massively parallel signature sequencing, MPSS) 对17bp的mRNA和小RNA信号分析得知，超过40%的mRNA是由基因间序列或是基因的内含子序列转录而来的，这说明着丝粒DNA中很多重复序列是可以转录并行行使功能的，着丝粒的形成与抑制基因转录活性没有本质的因果联系，同时也说明着丝粒DNA中的很多序列可能是来自于常染色体的基因编码区 (Yan et al. 2007) (图3-1)。着丝粒功能主要在有丝分裂和减数分裂期间完成，但基因转录是在剩余的细胞周期中进行，因此着丝粒区间的基因是可以转录的 (裔传灯和顾铭洪 2007, Nagaki et al. 2004)

表 3-1 第 3 染色体上 CENH3 结合域结合域及其旁邻的基因分布情况 (Yan et al. 2006)

Table3-1. Gene distribution in the CENH3 binding domain and its flanking domains

|   | 短臂旁邻区间                    |     | CENH3结合域             | 长臂旁邻序列                   |     |
|---|---------------------------|-----|----------------------|--------------------------|-----|
|   | Short arm flanking domain | arm | CENH3 binding domain | Long arm flanking domain | arm |
| 在Cen3上对应的序列长度 (kb)                          | 1-389                     |     | 389-1786             | 1786-2275                |     |
| Coordinates (kb) in the Cen3 virtual contig |                           |     |                      |                          |     |
| 序列长度 (kb)                                   | 389                       |     | 1397                 | 489                      |     |
| Size (kb)                                   |                           |     |                      |                          |     |
| 有EST或cDNA支持的基因                              | 19                        |     | 19                   | 27                       |     |
| Genes with EST/fl-cDNA                      |                           |     |                      |                          |     |
| 无EST或cDNA支持的基因                              | 9                         |     | 29                   | 24                       |     |
| Genes without EST/fl-cDNA                   |                           |     |                      |                          |     |
| 基因总数  | 28                        |     | 48                   | 51                       |     |
| Total number of genes                       |                           |     |                      |                          |     |
| 基因密度 (kb/gene)                              | 13.9                      |     | 29.1                 | 9.6                      |     |
| Gene density (kb/gene)                      |                           |     |                      |                          |     |



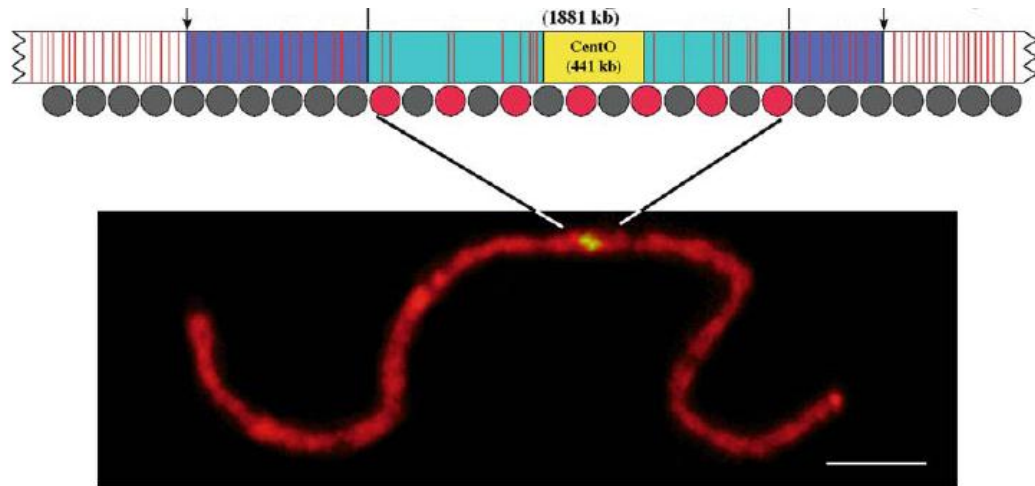


图 3-1 水稻第 3 染色体着丝粒 DNA 结构图 ( Yan et al. 2007)

Figure 3-1. Structure of the centromere of rice chromosome 3

在全长 3113kb 的 RSD 序列 (蓝色) 中有 1881kb CENH3 结合域 (青绿色), 其中又包含 441kb 的 CentO 重复序列 (黄色), RSD 边界由两个 DNA 分子标记 L708 和 R3235 确定位置, CENH3 结合域中有 19 个活性基因 (红色斑点), 基因密度低于常染色体。

Cen3 includes a ~1881 kb region associated with CENH3 (turquoise colour). This CENH3-binding domain includes ~441 kb of the CentO satellite repeat (yellow colour) and is embedded within a 3113-kb recombination-suppressed domain (blue colour). The boundary of the recombination-suppressed domain is marked by DNA markers L708 and R3235, both at 86 cM. The CENH3-binding domain contains active genes (red bars), but with a lower density than the flanking domains.

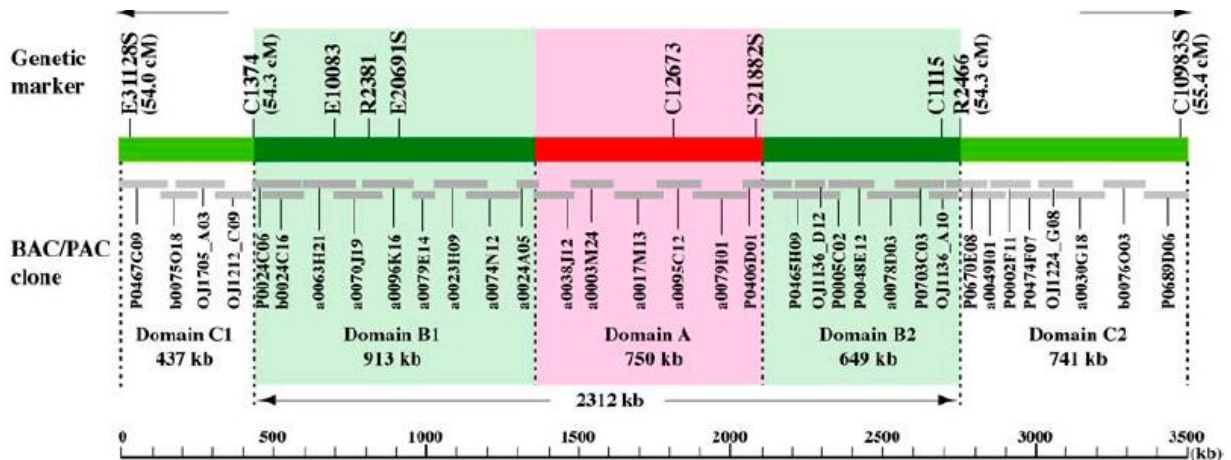


图 3-2 水稻第 8 染色体 3.5Mb 序列 (包括着丝粒 DNA) 图谱 ( Yan et al. 2005)

Figure 3-2. Map of the 3.5-Mb Region Spanning the Recombination-Free Region, Including the Centromere, of Rice Chromosome 8

无交换区位于遗传图谱 54.3 cM 处, 跨越 2312 kb 物理长度; 区间 A 包括 750 kb CENH3 结合域 (粉色); 区间 B1 (913 kb) 和 B2 (649 kb) (淡绿色) 位于区间 A 两旁; C1 (437 kb), C2 (741 kb) 为所分析的无交换区末端; 灰色矩形的 34 BAC/PAC 序列来自于 Genebank 和 3.5 Mb 的跨叠克隆群; 图上部为 10 个 RFLP 分子标记。

The recombination-free region is located at 54.3 cM on the genetic linkage map and spans 2312 kb. This region is divided into three domains. Domain A includes the 750-kb CENH3 binding region (in pink) (Nagaki et al., 2004). Domains B1 and B2 (in light green) flank domain A. The two distal domains, C1 and C2, flank the recombination-free region. Sequences of 34 BAC/PAC clones (gray bars) were downloaded from GenBank and assembled into the Cen8 virtual contig of 3,489,829 bp. The 10 genetically mapped RFLP markers in this region are shown at the top of the map.

## 2 水稻第 8 染色体着丝粒区间基因组分析及功能注释

### 2.1 着丝粒 DNA 序列分析

有研究表明,水稻的12条染色体序列中,第8染色体着丝粒区间的序列重复度相对最低,荧光原位杂交(FISH)实验结果显示卫星重复序列的长度大约只有64Kb(Cheng et al., 2002)。但是重复序列对测序结果的精确性仍有很大影响,造成不同的方法,不同实验室的结论多有出入。Wu等(2004)利用克隆步移法对该染色体1.97M着丝粒DNA的序列进行测序后得知,其中包括68.5kb的CentO(155bp)重复序列,以及超过220个转座子(transposable element, TE),这两部分的序列长度约占测序全长的60%。155bpCentO序列头尾随机的排布在染色体上,其间被TE插入打断,但无明显插入规律。此后,Ma等(2006)对此1.97M着丝粒DNA进行了进一步的研究,结果显示在此区间内有33个长末端重复序列(long terminal repeats LTRs),其中11个为首次发现。共有功能元件245个,占测序总长度的67%。Nagaki等(2004)在对1.65M的序列分析后发现,共有162个逆转座子,其中28个为CRR。在这些CRR中有4个为自主型的逆转座子大小在7.6-7.8kb之间,5个为非自主型逆转座子大小约为4.4kb,而其它的片断多为不完整的逆转座子或单独的长末端重复序列。虽然关于CEN8的研究已经很多,但是到目前为止CEN8区间到底有多长,还没有被明确界定。为了进一步揭示着丝粒序列复杂性及功能高度保守性的分子基础,Yan等(2005)利用粳稻日本晴和籼稻Kasalath杂交的186个F<sub>2</sub>个体构建了3.5Mb的跨叠克隆群,对应于遗传图谱上的位置为54~55.4CM,其中54.3CM处的无交换区跨越2312kb的物理长度,与10个RFLP标记共分离(图3-2)。

### 2.2 着丝粒 DNA 基因功能注释

在对着丝粒DNA进行测序,研究其序列组成的同时,各国的科学家们也投入了大量的人力物力,对已知的序列进行功能分析。Wu等(2004)研究结果显示,在1.97M的区间内,有201个开放阅读框架(ORF),48个基因的序列有全长cDNA支持或其表达产物与已知蛋白有较高的同源性,其中在CentO重复簇附近(分别约为8kb,4kb)存在着两个假设的活性基因TGF-beta 交互受体蛋白、叶绿体和叶缺陷蛋白(defective chloroplasts and leaves protein)的叶绿体前体。而Nagaki等(2004)分析了1.65M的序列后认为,此区间内存在有47个假设的基因,其中14个存在于着丝粒的异染色质区,而在这14个基因中至少有4个是活性基因,这一结果首次打破了人们关于异染色质无基因的传统认识(Schueler et al. 2001, Sun et al. 1997, Hosouchi et al. 2002)。随后Yan等(2005)又对3.5M着丝粒DNA及其旁邻序列进行了分析,结果显示在此区间内有225个基因,其中106个基因有EST或cDNA支持(79个基因可获得全长,27个只有部分转录元件),119个为电子预测基因(40个基因根据与已知基因同源性预测,79个完全为电子预测),还未得到EST或cDNA支持(表3-2, 3-3)。在750kb长CENH3结合域中,有16个功能基因,其中与拟南芥同源的7个,非同源的9个,基因密度为46.9kb/活性基因,远低于其两边的旁邻序列,这说明虽然着丝粒区间存在活性基因已被证实,但由于高度异质化及序列的高

度重复，此区间内的活性基因密度确实远低于常染色质区间，这可能也是多年来一直没有找到相应功能基因的主要原因。研究此区间176个基因结合的组蛋白结构显示，与活性基因结合的H4组蛋白乙酰化，H3K4组蛋白二甲基化程度较其它非转录区间高，这暗示着结合在着丝粒DNA序列上组蛋白的修饰程度可能与着丝粒DNA的进化时序有关。除此之外，他们还就预测无活性的基因，与拟南芥中有同源性的蛋白、逆转座子、转座子及小的反向重复转座子等进行了详细的比较分析研究（Yan et al. 2005）。

着丝粒被认为是真核生物结构基因组研究的最后目标，以植物特别是模式植物为材料，研究着丝粒区域DNA序列组成及其功能性着丝粒的DNA元件，确定着丝粒正常行使功能所必需的表观因子，阐明着丝粒DNA快速进化的分子机制等有着十分重要的理论研究意义。随着水稻基因组测序的完成，着丝粒的序列组成已经逐渐被人们所认识，但是有关着丝粒DNA序列及其相关功能分析还远不能详细阐明着丝粒的生物学功能，无法全面认识生物着丝粒进化及其对物种形成的影响。因此，有关功能性着丝粒序列以及其低序列同源度、高功能保守性的研究已经成为近年来分子生物学及分子遗传学的研究热点。

表 3-2 第 8 染色体 3.5Mb 序列中基因的 RT-PCR 分析 (Yan et al. 2005)

Table 3-2. RT-PCR Analysis of Genes Located in the 3.5-Mb Cen8 Virtual Contig

|                              | 完整转录的基因<br>Genes with<br>complete<br>transcripts | 未获得完整转录本的<br>基因<br>Genes with<br>incomplete<br>transcripts | 编码与拟南芥同<br>源蛋白的基因<br>Genes with protein<br>homologs | 假设基因<br>Hypothetical<br>genes |
|------------------------------|--|--|---|-------------------------------|
| 基因总数<br>Total no. of genes   | 79   | 27   | 40  | 79                            |
| 被测基因数<br>No. of genes tested | 71   | 27   | 22  | 78                            |
| RT-PCR 阴性<br>RT-PCR negative | 0  | 1  | 8   | 35                            |
| RT-PCR 阳性<br>RT-PCR positive | 71(100%)   | 26(96.3%)  | 14(63.6%)   | 43(55.1%)                     |

表 3-3 第 8 染色体 3.5M 序列中基因及重复片段分布 (Yan et al. 2005)

Table 3-3 Distribution of Genes and Repeats along the 3.5-Mb Cen8 Virtual Contig

| 序列特征                              | Domain C1    | Domain B1    | Domain A     | Domain B2    | Domain C2    |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Feature                           | 区间C1         | 区间B1         | 区间A          | 区间B2         | 区间C2         |
| 遗传学位置(CM)                         | 54.0-54.3    | 54.3         | 54.3         | 54.3         | 54.3-55.4    |
| Genetic position (CM)             |              |              |              |              |              |
| 3.5M序列对应物理距离                      | 1-437        | 437-1350     | 1350-2100    | 2100-2749    | 2749-3490    |
| Coordinate (kb)                   |              |              |              |              |              |
| 区间大小                              | 437          | 913          | 750          | 649          | 741          |
| Size (kb)                         |              |              |              |              |              |
| 活性基因                              | 28           | 32           | 16           | 38           | 48           |
| Active genes                      |              |              |              |              |              |
| 在拟南芥有同源性的蛋白                       | 12           | 20           | 7            | 24           | 17           |
| Protein homology                  |              |              |              |              |              |
| 在拟南芥没有同源性的蛋白                      | 16           | 12           | 9            | 14           | 31           |
| No protein homology               |              |              |              |              |              |
| 基因密度 (kb/活性基因)                    | 15.6         | 28.5         | 46.9         | 17.1         | 15.4         |
| Gene density (kb per active gene) |              |              |              |              |              |
| 活性基因覆盖率                           | 24.0%        | 15.9%        | 12.8%        | 19.8%        | 21.2%        |
| Active gene coverage              |              |              |              |              |              |
| 无活性或未分析基因                         | 15           | 14           | 13           | 7            | 11           |
| Inactive or unanalyzed genes      |              |              |              |              |              |
| 在拟南芥有同源性的蛋白                       | 6            | 6            | 10           | 2            | 2            |
| Protein homology                  |              |              |              |              |              |
| 基因总数                              | 43           | 46           | 29           | 45           | 59           |
| Total genes                       |              |              |              |              |              |
| 逆转录元件(kb)                         | 135.9        | 390.0        | 277.8        | 214.8        | 209.4        |
| Retrotransposon (kb)              |              |              |              |              |              |
| 转录元件(kb)                          | 10.1         | 55.0         | 32.9         | 33.1         | 51.3         |
| Transposon (kb)                   |              |              |              |              |              |
| 小反向重复转录元件(kb)                     | 10.2         | 15.4         | 8.4          | 20.1         | 17.6         |
| MITE(kb)                          |              |              |              |              |              |
| 其它或未知区间(kb)                       | 8.1          | 10.9         | 62.2         | 8.4          | 7.1          |
| Others or unknown(kb)             |              |              |              |              |              |
| 重复总数(kb)                          | 164.2(37.6%) | 471.3(51.6%) | 381.3(50.8%) | 276.3(42.6%) | 285.4(38.5%) |
| Total repeats (kb)                |              |              |              |              |              |

## 第四章 植物锚蛋白

锚蛋白(ankyrin)源于拉丁文ankyra,意为锚,它可以把骨架蛋白固定在质膜上,而细胞骨架对维持细胞形态是至关重要的,同时它也限制了膜蛋白的侧向扩散。作为重要的连接分子,锚蛋白可以直接将膜蛋白锚定在细胞骨架蛋白网络,同时其众多异构体可将细胞骨架连接到细胞器,如内质网、高尔基体等。由锚蛋白介导的连接并非简单的生理连接,通过它介导的膜蛋白和其他蛋白的相互作用,在多种生物活动中发挥着重要作用。近年来研究发现,锚蛋白有可能参与细胞凋亡和信号传导,并影响细胞信号传导的多个环节。锚蛋白重复序列(ankyrin repeat)是普遍存在于真核、原核及病毒中的一种蛋白质序列,其功能主要是参与蛋白质与蛋白质的相互作用。在已确定的400多种含有该基序的蛋白质中,就发现了约3000个ANK重复序列,由于该蛋白质家族成员中ANK在数目、一级序列以及空间结构上都存在差异,使得ANK模体能够与多种配体结合,实现纷繁复杂的生物功能。

### 1. ANK的结构特征

1987年, Breeden和Nasmyth在两个酵母细胞周期调控蛋白Swi6和Cdc10中,首次发现了ANK模体,随后在细胞骨架锚蛋白(ankyrin)中发现了含有24个此重复序列模体的结构,将其命名为锚蛋白重复序列模体(ANK repeats motif) (Breeden and Nasmyth 1987)。典型的ANK重复序列一般含有33个残基,数目不等的ANK单元串联起来,形成许多大的ANK结构域(ANK domain),行使生物功能。有关动物中锚蛋白重复序列的研究报道很多,其中主要包括细胞骨架形成体(cytoskeletal organizers), CDK(cyclin dependent kinase)抑制剂,转录调控因子,发育调控子,膜蛋白等。拟南芥和水稻等模式植物基因组测序发现锚蛋白重复序列也存在于许多植物蛋白中,但植物锚蛋白的研究还相对滞后,主要集中在有关信号转导中的自身防御、发育调控、物质转运及蛋白磷酸化等。因此,研究ANK模体对于认识这类植物蛋白质家族成员的结构和功能具有十分重要的作用,也必定会给植物信号传导的研究带来新的切入点。

锚蛋白作为一个调节蛋白由三个保守结构域和一个调节结构域组成。N末端为85-95kD的膜结合区,该区包含24个重复的由33个氨基酸残基组成的片段,即锚蛋白重复区,其序列GXTPLHXAAXXGHXXXV / AXLLXX GAXXN / DXXX中15个氨基酸是高度保守的,可见于所有的锚蛋白异构体中,而其余的氨基酸组成则在不同的异构体中存在差异。其重复序列介导不同蛋白质的识别 (Gorina and Pavletich 1996); C末端为调节结构域,也称可变区,该区功能未完全明了,推断C末端的变化可能与锚蛋白的某些特殊功能有关。保守残基的一级序列和二级结构可由图4-1表示 (Tschopp et al. 1999, Sedgwick et al. 1999)。同源性比较显示,蛋白质的功能越类似,其保守性就越强,从ANK家族蛋白质分子整体上看,具有保守性的氨基酸残基在结构上的作用大致可分为两类:一类参与每个独立重复序列的形成和构建;另一类形成各重复序列之间相互作用的表面残基,对整个ANK结构域起到稳定的作用 (Russo et al.

1998, Jacobs and Harrison 1998, Foord et al. 1999)。非保守残基集中在分子表面作为蛋白质识别和结合位点，而保守残基则包含蛋白质分子折叠所必需的信息 (Foord et al. 1999)。锚蛋白重复结构域主要由两个 $\alpha$ 螺旋和两个 $\beta$ 片层构成，折叠成 $\beta$ 桶结构。 $\beta$ 发夹与 $\alpha$ 螺旋构成的平面几乎垂直，几对 $\alpha$ 螺旋平行排列，依靠疏水作用相互堆积，形成一个紧密而舒展的螺旋平面，一侧疏水，另一侧亲水，在空间上则形成L型结构，整个结构域就像一只弯曲的手， $\beta$ 片层形成手指，而螺旋平面形成手掌部分，手指与手掌相互垂直，从而形成手心内部的一个疏水性深沟 (图4-1B)。保守残基在结构上可能参与每个独立重复序列构建或者形成各重复序列之间相互作用的表面残基，对整个ANK结构域起到稳定的作用 (Russo et al. 1998)。ANK中还有一个非常保守的基序TPLH形成的一个紧密转角(tight turn)，它是连接 $\beta$ 和 $\alpha$ 的纽带 (Zweifel et al. 2003)。一般来说， $\beta$ 发夹指尖残基可变，它并不参与结构的形成，因此，它很可能参与与目标蛋白的结合，不同残基结合不同的蛋白，便形成了其功能的特异性。同时，许多ANK家族蛋白质分子的ANK结构域并不完全保持典型的结构特征，有些ANK序列长度相对于其他单元较短，还有些ANK结构域有一些氨基酸序列会插入到两个ANK重复序列之间或者是位于ANK模体的内部。这些结构上的变异，也使得ANK的空间结构多样化，能够结合的不同蛋白质配体，实现了功能上的多样化。

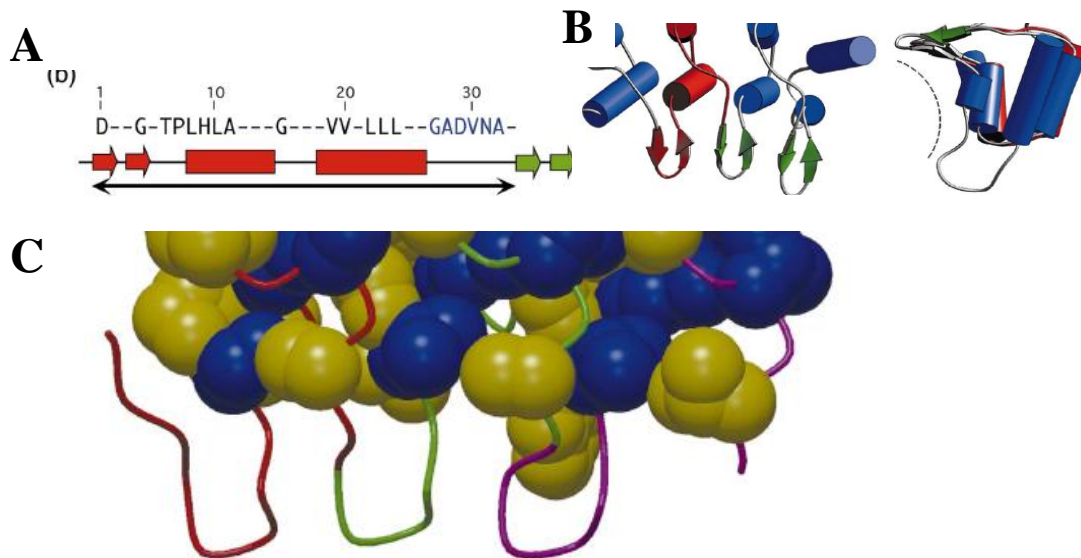


图 4-1 ANK的基本结构

Fig.4-1 The X-ray structure of ANK

A：保守的 ANK 重复序列；B：ANK 重复序列二级结构示意图；C：空间折叠后得 ANK 结构域

A: The ANK repeat consensus; B: The ANK repeat secondary structure; C: Assembly of the ANK-repeat domain

## 2 植物锚蛋白功能研究

### 2.1 锚蛋白参与自身防御

植物依靠敏感的认识机制,识别各种入侵的病原微生物,从而激活防卫反应、保护自己。遗传学研究发现有很多抗性基因参与防卫反应的信号传导,它们能被独立地激活。锚蛋白作为重要的调节因子,广泛参与植物防卫反应。应用突变体分析和基因克隆技术,已分离和鉴定了一些参与防卫反应的锚蛋白基因,例如:*At-Phos43*、*AKP2*、*ANK1*、*ACD6*、*DREB2*和*NPR1*等。Scott等(2001)用双向电泳结合质谱分析在拟南芥中分离得到一个43KD的蛋白质*AtPhos43*,细菌或真菌感染后几分钟内*AtPhos43*迅速被磷酸化,其C末端含2个锚蛋白单元,可能介导蛋白质的识别或相互作用。有趣的是表达分析发现许多植物如水稻、棉花、苜蓿等均存在*AtPhos43*的同源蛋白,而酵母、动物和人类均没找到其同源蛋白质,表明*AtPhos43*是一个植物特有的锚蛋白编码基因。Yan等应用酵母双杂交分离和鉴定了一个锚蛋白编码基因*AKR2*,*AKR2*蛋白C-末端有4个锚蛋白单元,而N-末端包含PEST序列,类似动物的I $\kappa$ B蛋白及植物NPR1/NIM1蛋白。用反义RNA抑制*AKR2*表达导致叶片小块坏死,并伴随产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,类似过敏反应。*AKR2*可能是PR-1的负调节子,还可能参与抗病和抗胁迫反应中的抗氧化代谢,锚蛋白重复序列在其中的具体作用还有待进一步研究(Yan et al. 2002)。Lu等在拟南芥中分离得到一个锚蛋白编码基因*ACD6*,它的编码产物影响和调节拟南芥防卫反应的SA(水杨酸)信号途径。*ACD6*是一个必需且剂量依赖的激活因子,在对病原体防卫反应和SA依赖的细胞程序死亡中起作用,它属于一个大的家族,编码的蛋白质含9个锚蛋白单元,N-末端有5个跨膜结构域(Lu et al. 2003, Dong 2004)。NPR1是从拟南芥中克隆到的系统获得抗性(SAR)的重要调节成员,NPR1突变体阻止水杨酸(SA)参与的系统获得抗性。NPR1包含锚蛋白重复序列和一个BTB域,以此与其它蛋白相互作用。例如酵母双杂交证明NPR1与bZIP特异性结合(Dong et al. 2001)。而Markus等发现烟草bZIP转录因子BZT-1的螺旋D1结构域与另一个锚蛋白ANK1相互作用,参与激素信号和病原体防卫反应(Markus K et al. 2003)。而Wirdnam等也从烟草中得到两个锚蛋白GBP1和GBP2。当GBP1或GBP2在体外和酵母中表达都能结合几丁质酶(HNI)和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(GLUI),而HNI和GLUI均参与对病毒、细菌、真菌等病原体的防御反应。GBP1的正反义RNA转化株表现出幼叶下垂卷缩,同时淀粉、蔗糖、果糖积累减少,说明GBP1/2属于植物特有的PANK家族成员,可能参与植物防御反应与糖代谢之间的关联。有趣的是正义GBP1转化株中GBP过量表达,而反义GBP1转化株GBP/TIPb表达减少,猜测只有GBP的适当丰度才能保证植物的相关防御功能(Wirdnam et al. 2004)。

### 2.2 锚蛋白参与物质运输

组织或细胞之间物质运输和信息交流,有机分子和无机离子的选择吸收和有序运输对植物的生长发育调控非常重要。植物中有很多锚蛋白基因参与物质的识别和运输。Pratelli等在葡萄中克隆了一个K<sup>+</sup>通道蛋白编码基因*SIPK*,它属于所谓的Shaker家族,与K<sup>+</sup>通道蛋白KAT

有很高同源性，不同的是它还含有一个小的锚蛋白结构域。*SIPK*与报告基因GUS的融合蛋白的组织定位分析发现它在葡萄中主要在保卫细胞中表达，而拟南芥中还在木质部的薄壁组织表达。*SIPK*可能调节植物蒸腾作用，以及控制葡萄浆果的含水量 (Pratelli et al. 2002)。而Sentenac等在拟南芥中也克隆得到一个 $K^+$ 转运的基因，其编码的多肽有三个结构域：一个与动物同源的 $K^+$ 通道形成区，一个环核苷酸结合域以及一个锚蛋白重复序列。该基因在酵母中表达能互补酵母 $K^+$ 缺陷株 (Sentenac et al. 1992)。随后Pilot等发现拟南芥含ANK的 $K^+$ 通道蛋白AKT有六个成员 (Pilot et al. 2003)。Li和Chye等在拟南芥中分离和克隆了一个锚蛋白编码基因*ACBP2*，该蛋白结合长链乙酰辅酶A，作为乙酰辅酶A的转运子，能维持胞内乙酰辅酶A库。与其它ACBP一样，*ACBP2*含有一个乙酰辅酶A结合域，但它还有N-末端的跨膜区以及C-末端的锚蛋白重复序列，酵母双杂交表明*ACBP2*很可能在质膜通过其C-末端的锚蛋白重复序列与拟南芥的乙烯响应因子结合蛋白AtEBP相互作用，从而参与乙酰辅酶A的转运 (Li and Chye et al. 2004)。

### 2.3 锚蛋白参与发育调控

生物体的生长发育是一个非常复杂的过程，发育过程中细胞、组织和器官内一系列按时间和空间顺序发生质变的规律是植物遗传信息在内外条件影响下顺序表达的结果。其发育中会涉及到一系列植物的极性、模式的决定，组织间的相互作用、细胞分化、细胞识别以及核-质关系等生物学的基本问题。大量蛋白调节因子在不同时空水平上调控生物体的正常生长发育。Albert等分离了一个参与胚胎发育的锚蛋白编码基因*EMB506*，编码一个35KD的蛋白，在C-末端有5个锚蛋白重复序列。*EMB506*在配子发生期或早期胚胎中表达，而突变体*emb506*会出现胚胎发育受阻，而正常*emb506* cDNA互补突变株能产生种子，但顶端优势不明显，且产生不定芽或苞叶。*EMB506*可能通过其锚蛋白重复序列识别蛋白，调节植物的胚胎发育 (Albert et al. 1999)。Zhang等克隆和鉴定了一个参与质体发育的基因*AKR*，其编码的蛋白质包含4个典型的锚蛋白重复序列。*AKR*基因光依赖性表达，而且含两个或多个正反义*AKR*的转基因拟南芥表现明显黄萎，这种表型能稳定遗传。大多数黄萎植株结实很少，黄萎叶片里类囊体膜减少以及基粒缺失说明正反义*AKR*抑制了叶绿体的分化，而锚蛋白重复序列可能在叶绿体的分化中起了重要的调控作用。值得说明的是正义*AKR*沉默的作用机理还不太清楚，可能是在转录或DNA修饰过程中导致基因沉默，也有可能跟*AKR*基因本身的特异性有关，正义*AKR*植株产生含4个锚蛋白重复序列的多肽，一旦这些多肽翻译或折叠正确，就可能与*AKR*形成竞争性的抑制，通过其锚蛋白重复序列结合相关蛋白 (Zhang et al. 1992)。Victor等用转座子标记分离到一个拟南芥突变体*chaos*，表现出类囊体核编码天线蛋白显著减少、叶绿素和类胡萝卜素耗尽以及光合作用的捕光不足。克隆得到该基因*CAO*，编码一个43KD的蛋白cpSRP43，含4个锚蛋白重复序列和一个染色质结合域，在叶绿体内cpSRP43与cpSRP54特异结合。序列分析发现cpSRP43是一个植物特有的蛋白，可能通过其锚蛋白重复序列识别cpSRP54，作为叶绿体信号识别系统(cpSRP)的成员，参与捕光色素蛋白复合物(LHCP)的转运和定位 (Victor et al. 1999)。锚蛋白还参与转录水平的调控，Bouche等筛选cDNA表达文库发现一类转录激活蛋白家族CAMTA，存在于在各种多细胞生物体，拟南芥中共有6个CAMTA基因，其中有些含



CAMTA蛋白含有锚蛋白重复序列 (Bouche et al. 2002)。Zhang等年发现了一个新的锚蛋白编码基因 (SRC interacting protein *SIP*)，在细胞质中与类固醇激素受体共激活子 (steroid receptor coactivators, SRC) 相结合。用酪蛋白激酶 诱导该基因脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸及苏氨酸位点磷酸化后，其表达产物失去与SRC互作能力，SRC激活类固醇激素受体进行后续的生物反应。功能丧失和功能获得实验结果显示，该锚蛋白的生物学功能主要是缓冲SRC等激活子的激活效应，调节转录因子活性 (Zhang et al. 2007)。而Ha等在拟南芥中发现一个含BTB / POZ及ANK结构域的蛋白BOP1，其插入突变出现明显的叶损伤，而表达模式研究发现它在幼叶原基、基叶近轴、花芽、萼片及花瓣均有表达，表明BOP1可能参与调节侧生器官形态建成 (Ha et al. 2004)。Kumagai等利用图位克隆的方法找到了一个控制豆科植物与根瘤菌共生固氮识别的基因 (ineffective greenish nodules 1, *IGN1*)，编码一个新的跨膜锚蛋白。*ign1*突变体表现为根瘤极度早衰、不规则伸长，不再特异识别并与根瘤菌共生，而是同时与多种细菌共生，完全失去固氮能力。这说明*IGN1*基因在识别共生菌并进行生物固氮方面是必须的 (Kumagai et al. 2007)。

CaM作为最重要的一类Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白，可以通过与其下游CaM结合蛋白(CaMBP)作用而调节细胞的生理功能。Choi等利用辣根氧化酶标记CaM，从水稻cDNA表达文库中筛选到一个CaM结合转录因子，其结构与拟南芥中AtSRs/AtCAMTAs高度同源，编码103KDa的蛋白，包括三个锚蛋白重复序列。细胞定位结果显示该转录因子在细胞核内发生作用，其转录活性被CaM所调节。同源蛋白功能分析表明该转录因子参与Ca<sup>2+</sup>的信号转导过程，在植物环境应答反应 (如：光、温、激素及病原体损伤等) 中起作用 (Choi et al. 2005)。

## 2.4 锚蛋白激酶

现在有关植物锚蛋白激酶的报道还很少，Chinchilla等在紫花苜蓿的原发或继发根结节中发现Msapkl的表达，它是一类新的蛋白激酶，其N-末端有3个锚蛋白重复序列，在渗透压力下，Msapkl从3小时开始表达，2天到达最高。RT-PCR在拟南芥中找到了Msapkl的同源基因 (Chinchilla et al. 2003)。而其它还有有关植物锚蛋白激酶在细胞黏附中起作用的报道。

## 2.5 锚蛋白与细胞骨架相互作用

细胞骨架是位于细胞核和细胞膜内侧面的一种纤维状蛋白基质，细胞骨架参与细胞的多种功能，如细胞分裂、运动、内吞外排作用、细胞间黏连、轴突的物质运输等，而且它还调节受体介导的信号传导 (Molitoris 1997)。血影蛋白是细胞骨架的主要成分，由 $\alpha$ 和 $\beta$ 二个亚基组成，血影蛋白亚基与锚蛋白的N末端部位相互作用。锚蛋白也可与中间丝和微管偶联，这表明锚蛋白参与中间丝和微管与膜的连接。同时锚蛋白与血影蛋白的结合促进了其与红细胞膜骨架蛋白如肌动蛋白的相互作用。

## 2.6 锚蛋白重复序列与泛素连接酶

泛素连接酶通过调控蛋白泛素化过程,参与细胞内的多种生理过程,但近年来研究发现,该酶的蛋白结构中经常包含有锚蛋白重复序列及环状锌指结构域。Nodzon等在拟南芥中发现了一个泛素连接酶编码基因 $XBAT32$ ,其表达产物包含一个锚蛋白重复序列及一个依赖锌离子的环指结构。 $xbat32$ 突变体表现为侧根发育缺陷,细胞分裂标志物CYCBI表达显著减少,激素处理其突变株诱导刺激初生根中 $XBAT32$ 表达,而且部分刺激次生根的生长,功能互补实验表明 $XBAT32$ 基因可以使突变体的侧根发育回复正常,且在主根维管束系统中大量表达。因此, $XBAT32$ 可能是一个新的泛素蛋白连接酶,参与侧根发育(Nodzon et al. 2004)。此后Huang等利用cDNA芯片检测了铁炮百合(*Lilium longiflorum*, lily)花粉发育相关的1536个cDNA的转录情况,又找到了一个LANK(lily ankyrin repeat-containing protein)蛋白,该蛋白同样包含锚蛋白重复序列及一个环指结构。LANK编码基因的过表达分析及瞬时沉默实验结果显示,LANK基因的异常表达导致花粉管生长势减弱及花粉萌发率降低。结合RNA分析结果,他们认为LANK基因的编码产物是一种粘附在细胞膜上的泛素结合酶,调节花粉管生长极性(Huang et al. 2006)。在水稻抗病性研究中已被广泛应用的 $Xa-21$ 是第一个被克隆的水稻抗病基因,该基因编码一个有1025个氨基酸组成的受体类似的激酶,其基因产物包含胞外富含亮氨酸的重复序列(LRR)结构域和胞内丝氨酸-苏氨酸激酶(STK)结构两部分。 $Xa21$ 结合蛋白( $Xa21$  binding protein 3,  $XB3$ )是 $Xa21$ 丝氨酸、苏氨酸激酶的作用底物,Wang等研究发现该蛋白也有两个结构域:一个锚蛋白重复序列和一个环指结构域,分别用于结合 $Xa21$ 激酶和行使泛素连接酶E3的生物学功能。降低 $Xb3$ 基因表达量的转基因植株表现为水稻白叶枯病抗性减弱, $Xa21$ 激酶积累量减少。这些研究结果表明, $XB3$ 在调节水稻 $Xa21$ 蛋白积累水平及 $Xa21$ 介导的抗病性方面有着十分重要的生物学作用(Wang et al. 2006)。现有的研究结果已经证实,环指结构是泛素连接酶E3三种结构类型中的一种, RingE3s通过环指结构域别构激活泛素结合酶E2,促进由E2直接催化的底物Lys残基的泛素化(Skowrya et al. 1999),但是锚蛋白在泛素连接酶E3中究竟起怎样的作用,现在还没有定论。而上述的实验结果可能预示着锚蛋白在泛素连接酶介导的蛋白泛素化降解过程中起识别、结合目的蛋白的作用,参与植物生长发育中的蛋白降解。

由于锚蛋白介导不同蛋白大分子的识别,表明其可作为功能广泛的调节因子介导蛋白质-蛋白质的相互作用,参与复杂的生物功能。锚蛋白主要在细胞内外的信号传递过程中起联系和调节作用。事实上,复杂的生物反应大部分正是通过有限的蛋白质结构基序完成的。蛋白质的进化既需要关键氨基酸的保守性来保持结构上的完整性,又要通过序列上的变化来实现功能上的特异性和生物多样性。正如ANK模体,螺旋堆积内保守的疏水性残基既保证了整个ANK结构域的形成和稳定,同时,发夹指尖和其他非保守元件的插入又为其功能多样性提供了结构基础。深入研究植物锚蛋白功能对于阐明蛋白质-蛋白质相互作用以及植物信号传导的规律具有重要意义。

## 第五章 蛋白质的泛素化系统

### 1 泛素化系统的组成

泛素化途径由一系列的蛋白质组成，包括泛素、泛素连接酶、脱泛素酶以及蛋白酶体，主要存在于细胞核、细胞质中，也存在于细胞膜上，能选择性地降解细胞内变性、变构或错误翻译的蛋白以及各种调节蛋白等，因而在细胞周期的控制、免疫应答、胁迫反应和细胞程序性死亡等许多细胞内基本生理过程中起重要作用（Hershko and Ciechanover 1998, Glickman and Ciechanover 2002）。泛素蛋白酶体途径是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径。

泛素化途径涉及泛素、泛素激活酶E1、泛素结合酶E2和泛素连接酶E3的一系列反应：首先在ATP供能的情况下泛素激活酶E1激活泛素，然后通过硫酯键与E2的活性位点的Cys相连将泛素转移到泛素结合酶E2上。E2可以直接将泛素转移到靶蛋白的Lys残基上，但一般靶蛋白的泛素化需要一个特异的泛素连接酶E3。根据E3与底物的相对比例可以将底物单泛素化修饰和多聚泛素化修饰。多聚泛素化修饰的靶蛋白一般被26S的蛋白酶体所降解此途径被称为泛素蛋白酶体途径，简称泛素化途径。多聚泛素化修饰的靶蛋白(如变性、错误折叠或过量表达的蛋白质以及细胞中的许多调控蛋白)可以通过泛素化途径被降解从而对细胞周期调控、胞吞作用、信号转导、DNA修复、蛋白质的质量控制(例如Bsd2在膜蛋白的质量控制方面)、细胞凋亡等过程具有重要的作用（Hettema et al. 2004, Pickart 2000, Shih et al. 2000）。单泛素化修饰是一种调节信号可以引起靶蛋白的活性、定位以及蛋白质结构的改变从而对蛋白质的胞吞途径、膜泡的出芽、组蛋白的修饰、基因的转录以及蛋白质核内的定位进行调节（Shih et al. 2003）。单独的泛素本身并没有任何生物功能，它只是一种分子标记蛋白，发挥作用必须在ATP提供能量的前提下依靠泛素途径的相关酶类及蛋白酶体。真核细胞中泛素化修饰后的靶蛋白可能被降解、可能被转移到细胞或细胞外的特定部位，也有可能导致靶蛋白的功能发生变化，这主要取决于靶蛋白所加的泛素链的结构，以及泛素链的长短（Hicke 2001）。因此蛋白质的泛素标签并不一定是一个死亡信号，人们现在提出了用蛋白质翻译后的泛素化修饰这个术语来准确地描述泛素连接到靶蛋白的这一生物事件。

#### 1.1 泛素

泛素(Ubiquitin, Ub)是1975年由Goldstein首先发现的一种在真核生物细胞内高度保守的多肽，单个泛素分子由76个氨基酸组成，分子量约8.5 kD，等电点6.7（Goldstein et al. 1975）。目前发现所有生物的泛素都是由多基因编码的；而且它的序列相当保守，比较人与酵母的泛素序列，只有3个氨基酸不同。泛素分子紧密折叠成球形，5股混合的 $\beta$ 片层形成一个腔样结构，内部对角线位置有1个 $\alpha$ 螺旋，这个结构称为泛素折叠。这个小蛋白含有一个明显的疏水核心

和大量的氢键，表现出特殊的稳定性，能够防止在结合和靶向性降解循环中变性失活，从而保证泛素循环的运行。从泛素折叠中突出的是具有一定变形性的C末端延伸部分，这个末端第76位含有一个必须的甘氨酸。末端Gly残基在泛素连接酶的作用下连接到底物蛋白的Lys残基上，形成单聚泛素化底物蛋白 ( Lee et al. 1998 )。同时，每个泛素分子具有7个Lys残基，在泛素连接酶的作用下，游离的泛素单体也能连接到已经连接到底物蛋白上的泛素的Lys残基上，主要是Lys8，此外还有Lys63和Lys2。形成多聚泛素化底物蛋白。随着研究的进展，又发现了许多类泛素蛋白(Ubiquitin-like proteins ,UBLs)( Glickman and Ciechanover 2002, Saitoh and Hinchev 2000 )。在一系列酶的催化下，类泛素蛋白也能与底物蛋白共价结合，但其功能目前还不清楚。

### 1.2 泛素激活酶

E1(Ubiquitin activating enzyme , E1)是催化泛素与底物蛋白结合所需要的第一个酶，但是对靶蛋白的特异性却几乎没有影响。E1是一种广泛表达的多肽，大约1100个氨基酸，含有位置固定的保守的半胱氨酸残基。E1有2个亚型，是由同一个mRNA在不同的起始位点翻译而成的，存在于细胞浆和细胞核中。酵母的E1基因失活后是致命的，说明这个蛋白对于细胞的生存是至关重要的。E1可以水解ATP，与泛素的羧基末端形成高能硫酯键而激活泛素。在E1的作用下，泛素C末端Gly 残基与E1的Cys残基形成一个高能硫酯键，同时伴随着ATP水解，形成E1-Ub复合物( Glickman and Ciechanover 2002 )。E1-Ub复合物是一种短暂存在的中间产物，活化的泛素分子很快就通过转酯作用从E1的Cys残基转移到E2的Cys残基上，形成E2-Ub复合物。E1具有高度的催化效能，在低浓度的情况下就能够激活泛素，满足下游的级联反应过程 (Pickart and Eddins 2004)

### 1.3 泛素结合酶

级联反应的第二步是泛素分子经过转硫醇反应从E1半胱氨酸残基转移给E2 (Ubiquitin conjugating anzyme , E2 )活化的半胱氨酸位点。E2是催化泛素与底物蛋白结合的第二个酶。含有一个保守的14~16 kDa的核心区域，其内包含活性所需的Cys残基，位于蛋白表面的裂隙内(Hamilton et al. 2001)。能接受从E1-Ub复合物转移过来的活化的泛素分子，形成E2-Ub复合物。E2可能具有直接识别底物蛋白的能力，能直接催化E2-Ub复合物上的泛素分子与底物蛋白或底物蛋白上的泛素分子结合 (Robinson and Ardley 2004 )。更多的情况是，在泛素连接酶 ( E3 ) 的协同作用下，E2-Ub复合物把活化的泛素分子转移到底物蛋白，形成单泛素化蛋白或者多聚泛素化蛋白( Glickman and Ciechanover 2002 )。E1和E3通过相同的基序与E2连接，这说明在反应循环过程中，E2必须在E1和E3之间穿梭往返运行。因此为了保证在激活的泛素与数量巨大的E3之间得到平衡的分布，需要多个E2异构体。E2-Ub非共价结合的亲和力非常低，说明其在转移泛素分子到靶蛋白上起着重要的作用。

## 1.4 泛素连接酶

E3(Ubiquitin ligating enzyme, E3)是泛素化途径中发现最迟,种类最多,在底物的特异性选择降解过程中作用最为关键成员(Hellmann and Estelle 2002)。泛素蛋白酶体途径可分为三步:靶蛋白的识别;将泛素连接到靶蛋白的特定位点;通过26S蛋白酶体或者溶酶体的作用执行其相应的生理功能。泛素连接酶E3决定靶蛋白的特异性识别,在泛素途径中具有重要的作用。泛素连接酶E3通过调节蛋白的泛素化过程参与细胞内的多种生理过程。所有的E3都具有连接靶蛋白和特定E2的能力。蛋白质特定的翻译后的修饰经常作为其相应的泛素连接酶E3识别的标志。例如:泛素连接酶SCF<sup>Cdc4</sup>识别细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶CDK(cyclin-dependent kinase)抑制子Sic1时就需要Sic1在其特定位点的磷酸化,否则不能被E3中的SCF<sup>Cdc4</sup>识别进入泛素降解途径。正确的识别可能有助于生物体对细胞周期进行精确调控,避免某些细胞组织或器官生长异常(Orlicky et al. 2003)。现在发现鉴定的泛素连接酶E3主要有两大类:HECT结构域家族和RING结构域家族,最近又发现了一类新的E3家族:U-box蛋白家族。

### 1.4.1 HECT E3的结构及可能作用机制

HECT结构域(homologous to E6-AP carboxyl terminus, HECT)家族的泛素连接酶E3是目前所知的唯一的可以和泛素形成硫酯键中间体的泛素连接酶,并且它可以直接催化靶蛋白的泛素化。HECTE3有一个分子量大约为40 kDa的具有保守性的羧基末端催化结构域,即HECT结构域。HECTE3的N末端不具有保守性,但其中部分氨基酸残基Arg506、Glu539、Glu550和Asp607具有非常高的保守性,任何一个氨基酸残基的突变都会导致与泛素形成硫酯键的能力降低达90%以上,底物的特异性识别也由N末端决定。此结构域至少具有四种生物学功能:

通过其连接特定E2;接受来自于E2的泛素,并且通过它的Cys活性位点与泛素形成通过硫酯键连接的中间体;通过催化泛素与底物上Lys侧链的氨基形成异肽键从而将泛素转移到靶蛋白上;负责转移泛素到正在延长的多泛素链末端从而延长泛素链(Wang et al. 1999)。与HECTE3相对应的E2构成一个亚家族,在此亚家族内每一E2成员都对特定的HECTE3有偏爱性,这归因于E2和HECT结构域的特异性。

### 1.4.2 Ring结构域家族的泛素连接酶 E3及可能作用机制

缺乏HECT结构域的E3在亚基组成和氨基酸序列上是多样的,但大部分含有与E2相连的RING结构域。RING结构域家族最典型的特点是具有环指结构域(Ring finger domain),RING结构域是此家族具有泛素连接酶作用的重要因素。RINGE3中RING结构域的氨基酸序列为:Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>1-3</sub>-His-X<sub>2-3</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys(C<sub>2</sub>HC<sub>4</sub>),并且每一环指结构域连有两个锌离子。RINGE3的E3活性依赖于环指结构域,并通过其与泛素结合酶E2相连。尽管RINGE3中RING结构域是泛素连接酶活性所必须的,但并不是所有含有RING结构域的蛋白质都具有RINGE3的活性。例如:家蚕核多角体病毒中有6种编码含有RING结构域的蛋白质,但

只有其中的3种被证明具有RINGE3活性。另外3种无活性原因可能是因为其RING结构域中无与E2连接所需要的凹槽结构 (Imai et al. 2003)。此实验还证明了锌离子是RING E3具酶活性所必需的, 因为环指结构域维持其特定的构象需要锌离子。RINGE3的功能是将E2和底物集聚在一起, 它可以通过增加E2周围底物的有效浓度促进底物的泛素化。因此人们提出了一种假说, 认为E2在其在E3连接部位精确安置对E3的活性有重要作用。除了集聚E2和底物外, RINGE3也可能对底物泛素化位点的选择有作用, 即RINGE3作为骨架使E2和底物达到最佳定位以便完成泛素由E2转移到底物特定位点的修饰。

含有环指状结构域的E3可被分成2种类型, 一种是单个蛋白, 其代表是作为P53-E3的MDM2(mouse double minute 2)癌蛋白(Honda and Yasuda 2000)以及作为受体酪氨酸激酶如表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和血小板衍生因子受体(platelet-derived growth factor receptor)E3的c-Cbl(Tsygankov et al. 2001)。另一种是多蛋白组成的复合体, 包括SCF(Skp1-Cullin/Cdc53-F-box-Rbx1)、有丝分裂后期促进复合物(aftaphase promoting complex, APC)和VBC-Cu12复合体(the yon-Hippel-Lindau-elongins B and C-Cu12 complex)。

SCF-E3是至少有4种多肽组成的复合体。被命名为SCF是因为其中的三个核心亚基(Skp1、Cullin/CDC53和一个F-Box蛋白)。后来第四个亚基Rbx1 (RING box 1 protein)被发现, 其含有一个RING-H2型结构域。在SCF-E3中的Rbx1能够集合E2, Cullins蛋白作为Rbx1与蛋白之间的支架参与底物的选择性。底物的识别由底物特异性的F-box蛋白所介导, F-box本身被SCF-E3复合体中的Skp1接头因子所识别和聚集。Skp1与Cullins结合, 因此将底物和泛素并列排开。F-box蛋白的特征是含有一个大约40个氨基酸的基序, 最初在细胞周期蛋白F中鉴定出来。APC的核心颗粒至少含有13个亚基, 最初发现在降解Cyclin的过程中起着重要作用。随后研究表明, 其具有控制在有丝分裂进展和结束过程中重要因子半衰期的功能( Passmore et al. 2005)。APC中的2个亚基APC2和APC11分别与SCF-E3复合体中的Cullin1和Rbx1相关, 推测APC2可能具有连接其它亚基的作用, 而APC11则具有结合Ub-E2中间体的作用。

#### 1.4.3 U-box结构域家族的泛素连接酶 E3结构特点及其可能作用机制

U-box家族的泛素连接酶E3是真核细胞蛋白质翻译后质量控制所必需的。此类蛋白质的C端都包含一个大约70个氨基酸残基的从酵母菌到人类具保守性的U-box结构域。U-box蛋白家族的泛素连接酶E3开始被认为是一个多聚泛素链的装配因子E4, 在与E1、E2和E3的共同作用下催化靶蛋白多聚泛素链的形成 (Koegl et al. 1999)。后来被证明E4是泛素连接酶E3的一种新的类型, 而其促进多聚泛素链的装配反映了特定泛素连接酶E3的酶活性。U-box家族的泛素连接酶E3的作用机制开始认为和HECT家族的作用机制类似: 通过U-box结构域与泛素结合酶E2相连, 然后与泛素通过硫酯键结合形成中间复合体, 最后催化靶蛋白的多聚泛素化修饰。但是此家族E3的U-box结构域内部没有保守的Cys残基, 甚至此家族的有些成员在U-box结构域中根本不含任何Cys残基。因此这种作用机制不成立。事实上此蛋白质家族是通过U-box结构域与泛素结合酶E2相互作用从而将泛素直接从泛素结合酶E2转移到靶蛋白将其泛素化修饰 (Hatakeyama et al. 2001)。U-box结构域E3作为受体调节未折叠或错误折叠的蛋白质降解,

从而对蛋白质的质量控制起着重要作用 (Hatakeyama et al. 2004)。

### 1.5 蛋白酶体

一般情况下,多聚泛素化的底物蛋白随即被蛋白酶体识别并降解,同时释放可重复利用的泛素单体。26S蛋白酶体(Proteasome)是降解泛素化底物的一个ATP依赖型蛋白水解复合体,由20S核心蛋白酶(core protease, CP)和19S调节颗粒(regulatory particle, RP)构成。CP是由4个七聚体蛋白组成的环层叠在一起形成的一个空心圆柱体样结构(1.5.1.1),是26S蛋白酶体的水解核心。活性位点位于20S圆柱体空心结构中心的2个孔上,含有胰蛋白酶、糜蛋白酶和谷氨酰样肽水解活性,具有能够使大多数肽键断裂的能力(Voges et al. 1999)。靶蛋白进入蛋白酶体需要传送蛋白底物的辅助,这些蛋白含有UBL或UBX(ubiquitin-like protein)和UBA(ubiquitin-associated)结构域,包括Rad23(radiation gene 23)、Dsk2(dominant suppressor of Kar2)、Ddil(DNA damage molecule-1)和Shp1/p47。底物与蛋白酶体的结合有许多直接和间接的机制。这些不同的机制为多种蛋白在蛋白酶体中提供了选择性降解过程。综上所述,26S蛋白酶体降解泛素化底物的程序为:RP辅助识别和伸展适当的底物,裂解与Ub连接的共价键,开放孔环,然后伸展开的多肽直接进入CP的腔内被断裂成6-10个氨基酸长度的片断,最后在胞浆中被水解成单个氨基酸。

### 1.6 脱泛素酶

与磷酸化修饰蛋白质类似,泛素化也是一个可逆的过程。已经发现真核细胞内有许多种脱泛素酶(Deubiquitinating enzymes, DUB)能够水解泛素和蛋白质间的硫酯键(Clague and Urbe 2006)。DUB可分为两类:一类是泛素羧端水解酶,通常水解去除和泛素C端连接的小肽,也参与由泛素前体产生泛素单体的过程;另一类是100kD的泛素特异性加工酶,其主要功能有:水解已经被蛋白酶体识别并即将被降解的泛素缀合蛋白上的多聚泛素链,释放可重复利用的泛素单体;被错误泛素化的泛素缀合蛋白上的泛素或泛素链的去除;修饰底物蛋白上的多聚泛素链,使之更易于被26S蛋白酶体识别(Saitoh and Hinchev 2000)。值得指出的是,用蛋白抑制剂处理细胞后,细胞内聚集的多是未泛素化的底物蛋白,说明细胞内有大量已激活的DUB。此外,细胞内还有许多与泛素有一定的同源性的蛋白质。一类称作泛素样蛋白,它们与泛素类似,也能够利用分子C-端的甘氨酸和其他蛋白质共价结合,其中研究得比较多的是含101个氨基酸残基的SUMO-1(small ubiquitin-related modifier I)。与泛素不同的是,SUMO不含有泛素中参与多聚化的若干赖氨酸残基,不能形成SUMO-SUMO链,因而不是蛋白质降解的标记。已发现许多蛋白质可被SUMO修饰,其中包括转录因子、核或膜转运蛋白及参与DNA复制和修复的酶等。SUMO修饰对这些蛋白质的影响各不相同,有的激活转录,有的避免被泛素化降解,这暗示着SUMO系统的功能可能是调节泛素化系统的活性,增加蛋白质在细胞内的稳定性(Dye and Schulman 2007)。综上所述,脱泛素酶是泛素化途径的重要调节因子。

## 2 泛素化系统的功能研究

泛素化系统的生物学功能广泛，参与细胞周期控制、免疫应答、胁迫反应和细胞程序性死亡、DNA修复等一系列基本生理过程，涉及细胞内异常蛋白和各种调节因子的降解、细胞膜受体蛋白的修饰以及一些前体物质的加工等。

### 2.1 泛素化系统调节的蛋白降解

不良外界条件、植物体内自由基累积及蛋白质合成、翻译以及翻译后的折叠、修饰过程发生错误都会产生一些异常蛋白，对细胞造成危害。通过泛素化途径细胞就可以特异的降解这些异常蛋白( Hershko and Ciechanover 1998 )。如分泌蛋白或者与分泌途径相关的一些蛋白，大部分蛋白质经修饰后被转运到高尔基体、细胞膜或者被分泌到细胞外，而一些未被正确修饰的蛋白则保留在内质网中。这些蛋白被转运回细胞质或被暴露在内质网的胞质面，进而被泛素化途径识别并降解。调节细胞内各种生理过程的一系列调节因子在完成其相应的生物学功能后，绝大部分也是通过泛素化途径被迅速降解的( Glickman and Ciechanover 2002 )。如合成于细胞间期的细胞周期蛋白B，在细胞分裂中期结束后，迅速被泛素化途径识别并降解，从而确保细胞顺利进入下一个分裂时期( Ciechanover 1994 )。生长素/吲哚乙酸( Aux/IAA )蛋白，在没有生长素信号刺激的情况下通过与生长素应答因子( auxin response factors , ARFs )结合形成异源二聚体，阻碍ARFs执行功能，而当植物接受生长素信号刺激时，生长素就会促进Aux/IAA与泛素连接酶E3-SCFTIR1作用，降解Aux/IAA蛋白，释放出的ARFs与DNA相结合，调节生长素相关基因表达( Gagne et al. 2002, Hellmann and Estelle 2002, Kepinski and Leyser 2002, Gray et al. 2001, Leyser 2001 )。

### 2.2 细胞膜受体蛋白的修饰

细胞膜表面有很多受体蛋白，能接受细胞外信号，并传递到细胞内。泛素化系统参与一些膜受体蛋白的信号传递过程( Michael et al. 2002 )。一些细胞膜受体蛋白与相应的配体结合后随即被泛素系统识别并泛素化。膜受体蛋白一般发生单泛素化或者寡聚泛素化，也有一些膜受体蛋白发生多聚泛素化。泛素化的受体蛋白并不随之被蛋白酶体识别而降解，而是作为一种活性物质激活细胞内相应的生理反应，如 $\text{E}^3$ 因子受体蛋白泛素化后引发细胞的内吞作用( Glickman and Ciechanover 2002 )。

### 2.3 一些前体物质的加工

刚合成的蛋白质往往没有生物活性，一般要经过一个翻译后加工过程。泛素化途径参与某些蛋白质前体的加工。如转录因子NF- $\kappa$ B的一个亚基P50的前体是一个105kD的蛋白，该蛋白被泛素化途径识别后，其C端部分被26S蛋白酶体降解，残余N端完整的50kD片段即为有活性的P50( Palombella et al. 1994 )。



## 2.4 泛素化系统参与免疫应答

泛素化系统除了具有清除衰老、损伤及错误折叠蛋白的功能外,近年来许多研究发现,该系统还可以通过作用于免疫信号转导因子来调控免疫应答。无毒基因*Avr9*编码一种特异性激发子,它们可以触发抗性基因决定的特异性防卫反应。用*Avr9*激发子处理转番茄叶霉病抗性基因(*Cf-9*)的烟草,具有和叶损伤相同的诱导效应。诱导一种具有U-box ARMADILLO重复结构的E3连接酶编码基因*ACRE276*高效表达,开启植物的免疫应答反应。RNAi沉默*ACRE276*基因的*Cf-9*转基因植株失去病原诱导的超敏反应,叶霉病抗性大幅降低。结合与该基因高度同源的拟南芥中PLANT U-BOX17 (*PUB17*)基因在*Cf-9*转基因植株中瞬时表达的结果发现,在茄科和十字花科植物中,*ACRE276*基因是超敏性细胞死亡防御机制中的正调控因子(Yang et al. 2006)。CMPG1是*Avr9/Cf-9*激发系统的另外一个诱导产物,编码烟草中U-box型E3连接酶,Rocío等(2006)研究发现该基因及其番茄同源基因在植物细胞防御及疾病抗性方面至关重要,该基因过表达后*Cf-9*转基因植株表现出强烈的超敏反应(Rocío et al. 2006)。丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)蛋白编码基因*AvrPtoB*转化植物后表现为抑制植物的细胞程序性死亡(programmed cell death PCD),研究发现该蛋白C-末端是与真核生物E3连接酶高度同源的U-box和环指结构,将其编码基因中编码E2结合酶结合域的序列突变转化番茄后,PCD抗性减弱,植物可以恢复免疫系统的应答机制(Janjusevic et al. 2006)。在水稻中Zeng等(2004)在水稻中利用*Spotted leaf 11 (spl11)*突变体,图位克隆精细定位找到了突变相关基因*Spl11*,结构预测发现该基因有一个U-box ARMADILLO重复结构,离体实验证明该基因编码蛋白有E3连接酶活性。稻瘟病侵染大量诱导该基因表达。因此Zeng等认为该基因与植物细胞死亡自我防御机制密切相关(Zeng et al. 2002, 2004)。

泛素化系统是细胞内ATP依赖的蛋白质选择性降解的主要途径,是真核细胞内重要的蛋白质质控系统,参与细胞凋亡、生物防御、细胞周期以及细胞内信号转导等多种生理过程,对维持细胞的稳态具有十分重要的意义。该途径在20世纪80年代初期首先被Avram Hershko、Aaron Ciechanover和Irwin Rose等几位科学家所认识,三人以此项成果共享2004年诺贝尔化学奖。经过30年的研究,人们对泛素化系统的组成和在生物体内的功能有了深刻的认识,但其参与多种生理过程的详细作用机理还未被阐明。相信随着技术手段的进步,泛素化系统会逐渐被揭示,从而丰富人们对细胞凋亡,免疫应答及等一系列生理生化机理的认识。

## 第六章 本研究的目的意义

水稻是我国最重要的粮食作物，也是禾谷类作物中基因组最小的一种，与其他作物之间存在广泛的共线性。随着水稻全基因组测序工作的完成，充分利用水稻功能基因组研究成果，鉴定、挖掘控制重要农艺性状的一系列新基因及调控因子，并将这些优异基因应用于作物品种改良，培育高品质，高产量的优良品种。对确保我国粮食安全具有重大的理论意义和实际意义。

各种突变体库的构建和集中保存，为分子生物学和育种学研究提供了巨大的资源平台。在此基础上发现并利用突变体，对于揭示水稻重要农艺性状的分子机理、调控途径至关重要。T-DNA 插入或其他转座子法构建突变体库的优势在于，如果连锁分析结果显示突变体是由插入事件引起，利用 TAIL-PCR 等方法便能迅速找到插入位点，突变基因的确定时间可缩短在一周以内；如果是由组织培养诱导的突变，则可通过图位克隆的方法寻找突变基因，从而提高了突变体库的利用效率。图位克隆的方法进行功能基因组研究，不受变异来源所限制，应用范围广泛。水稻基因组全序列的测定完成，大大降低了图位克隆所需的多态性分子标记的筛选难度，缩减了成本、提高了效率。自 1995 年利用图位克隆的方法找到了水稻白叶枯病抗性基因 *Xa21* 之后，几十个重要的功能基因如：*MOCI*、*BCI*、*ALK* 等均已被鉴定和克隆，在水稻功能基因组研究中发挥了巨大的作用。

本研究中涉及三个水稻突变体 性状分别为淡绿叶、温敏型黄绿叶、斑点叶，均来自于本实验室构建的 T-DNA 插入突变体库，遗传学分析和分子鉴定后发现，其突变来源于组培过程中的体细胞无性系变异并各自由一对单隐性核基因控制。本研究的目的是利用图位克隆的方法鉴定分离突变相关基因，并进行初步的功能研究。该研究将为克隆目的基因、阐明基因功能、了解其相应的生化机理及生物学作用途径，奠定理论基础并为突变基因的深入研究提供线索。

## 第二部分 研究报告

### 第一章 水稻着丝粒附近一个淡绿叶突变相关基因的定位分析

摘要：在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中，发现了一个以日本晴为遗传背景的温度钝感型淡绿叶突变体 $pgl2$  (pale green leaf 2)。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交，构建F<sub>2</sub>群体对突变基因进行精细定位。初定位结果显示目的基因与第8染色体SSR标记RM331连锁度较高，在该标记附近发展了14对INDEL标记，将突变基因进一步定位于着丝粒上2.37 Mb的区间，并对该区间候选基因进行了分析。突变体叶绿素的总量与对照相仿，但是叶绿素a/b比值趋于1，明显低于对照。推测突变基因可能与叶绿素a、b间的转化有关。研究结果为该基因的图位克隆奠定了基础。本文还就着丝粒中基因定位的引物设计方法进行了讨论。

关键词：着丝粒；图位克隆；淡绿叶突变体；叶绿素a/b

虽然不同的真核生物如拟南芥 (Copenhaver et al. 1999, Heslop-Harrison et al. 1999, Kumekawa et al.2000, Kumekawa et al.2001)、水稻 (Cheng et al. 2002, Nagaki et al. 2004, Wu et al. 2004, Zhang et al. 2004)、玉米 (Ananiev et al. 1998, Jin et al. 2004)、果蝇 (Sun et al. 1997, Sun et al. 2003) 和人类 (Schueler et al. 2001, Rudd et al. 2003) 等当着丝粒序列上没有保守性，但它们的结构特征却很相似，都包含着许多转座元件、卫星重复DNA、着丝粒特异逆转录转座子、长末端重复序列等，正是由于这些重复片段的大量存在，给着丝粒区间基因序列的完整克隆、测定以及正确拼接带来了巨大的困难。但是不同物种、同一物种不同染色体之间，重复序列的长短、重复次数的多少甚至同源性却又存在很大差别 (在同一物种中重复序列的同源性相对较高) (Copenhaver et al. 1999, Cheng et al. 2002, Ananiev et al. 1998, Sun et al. 2003, Schueler et al. 2001, Wayne and Willard 1987, Choo et al. 1991, Kaszas and Birchler 1996, Hosouchi et al. 2002)，这就给重复度比较低的着丝粒序列的研究带来了契机，到目前为止除了水稻第3、4和第8染色体的着丝粒序列精确测序、正确拼接外，其他着丝粒区间序列的测定仍有待突破 (Yan et al. 2007, Ma et al. 2006, Wu et al. 2004)。对着丝粒中基因功能的研究，其意义不仅在于对一个基因的阐释，而且还可以研究不同物种，同一物种不同染色体上，发挥相同功能的着丝粒区间是否也具有相同的功能基因，更重要的是着丝粒中功能基因的鉴定，还可能为常染色质和异染色质间的转换关系和相互作用的研究提供有价值的线索，进而明确真核生物系统的进化过程和规律。

叶片是植物进行光合作用，将光能转为化学能的主要器官，各种叶色突变体是研究光合系统结构、机理及调控机制的理想材料。近年来，利用叶色突变体，在拟南芥中克隆了 $PIF1$

(Huq et al. 2004) *PCB2*(Nakanishi et al. 2005) *DVR*(Nagata et al. 2005) *PORB* 和 *PORC* (Frick et al. 2003) *ATHCOR1* (Benedetti and Arruda 2002), 在大麦中克隆了 *Xantha-1* 基因 (Rzeznicka et al. 2005)。但有关水稻叶色突变相关基因的报道还不多。2003年Jung等首次报道用T-DNA插入突变的方法, 克隆了镁离子螯合酶H亚基(*OsCHLH*) 基因 (Jung et al. 2003), 编码Chlorina-1 和 Chlorina-9的另外两个镁离子螯合酶亚基基因 *ChlD* 和 *ChlI* 也已经被克隆 (Zhang et al. 2006)。Lee等则发现了两个与叶绿素a氧化酶高度同源的基因 *OsCAO1* 和 *OsCAO2* (Lee et al. 2005)。

我们在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中发现了一个淡绿叶突变体, 该突变体以日本晴为遗传背景, 在整个生育期均表现为淡绿色, 同时伴有半矮化、分蘖少、生育期延迟的表型。遗传学分析表明该突变是由一对单隐性核基因控制的, 利用图位克隆法将该基因定位于第8染色体着丝粒上2.37 Mb的区间。此研究结果不仅验证了着丝粒区间有功能基因的假说, 而且还可能为常染色质序列、异染色质序列以及核外叶绿体基因组序列相互间的进化关系提供有益的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

突变体材料来源于本实验室构建的以粳稻品种 (*Oryza sativa* L ssp. *japonica*) 日本晴为遗传背景的T-DNA插入突变体库 (朱正歌等2001)。

#### 1.1.2 主要分子生物学试剂、化学试剂和仪器

见附录。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 突变体的发现及遗传学分析

我们在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中发现了一个淡绿叶突变体, 对T0代植株单株收种, T1代种子播种在中国水稻研究所的试验田里。观察突变体表型。2004年夏以突变体为母本, 籼稻品种龙特普为父本杂交, 构建群体。2005年初在海南种植F1代, 种子全部播种, 自交后单株收种。2005年夏杭州种植F2代分离群体, 统计突变型个体与野生型个体的分离比。

### 1.2.2 突变体温敏特性的观察

在已报道的水稻叶色突变体中，很多材料的表型都会受温度影响，不同温度下叶色表现不同 (Chuong and Omura 1982, 舒庆尧等 1996, 崔海瑞等 2001, 邵继荣等 2004)。为了明确突变体表型与温度的关系，我们将突变体和非转基因对照植株同时种植于具有相同光质和光强的温度梯度培养箱(TG-100-A; Nippon Medical & Chemical Instruments, Japan)中，设置温度为24、27、30、33、36，观察突变体和对照植株在不同温度下的性状表现。

### 1.2.3 野生型和突变体叶绿素 a b的测定

以突变体和非转基因对照生长20 d的幼苗新鲜叶片为材料，取0.1~0.5 g，剪成1 cm左右的片段浸泡于10ml 80%的丙酮溶液中，在26℃的黑暗条件下浸泡48 h。用分光光度计在645 nm和 663 nm两个波长下测量溶液的光密度，两次重复。按照Arnon等 (1949) 的方法计算叶片的总叶绿素 (Chl, chlorophyll)、叶绿素a (Chl a) 和叶绿素b (Chl b) 的含量，公式如下：

$$\text{chl } a=(12.7D_{663}-2.69D_{645}) \quad V/W$$

$$\text{chl } b=(22.9D_{645}-4.68D_{663}) \quad V/W$$

### 1.2.4 光合作用的测定

孕穗期用LiCor-6400型便携式光合作用测定仪测定突变体以及对照的净光合速率。测定部位均为主茎或者大分蘖剑叶，人工光源采用水稻饱和光强1500  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$  的光照条件。3次重复，每个重复，待读数稳定后分别读取5次，取平均值。

### 1.2.5 水稻总 DNA的提取

按照卢扬江和郑康乐(1992)报道的方法提取转基因水稻的DNA(卢扬江和郑康乐1992)。

- ∅ 取约100mg新鲜或冻存的水稻幼嫩叶片用液氮速冻后研磨成粉末；
- ∅ 将粉末转入1.5 ml离心管中，加入700 $\mu\text{l}$  65℃预热的抽提缓冲液 (100mM Tris-HCl, pH 8.0; 20mM EDTA; 500mM NaCl; 2.0% SDS)，65℃水浴30~60min，其间不时振摇混匀；
- ∅ 加入550 $\mu\text{l}$ 氯仿异戊醇混合液，其中含4:20:76的异戊醇：乙醇：氯仿 (V/V)，颠倒混匀，室温放置几分钟，使其自然分层；
- ∅ 10000rpm，离心6min取上清液；
- ∅ 加入500 $\mu\text{l}$ 预冷异丙醇，小心混匀，静置5min，12000rpm离心5 min
- ∅ DNA沉淀在70%乙醇中洗一次，晾干后，溶于200 $\mu\text{l}$  TE中；
- ∅ 凝胶电泳检查DNA质量。

### 1.2.6 突变体与 T-DNA 共分离分析

为了验证该突变是否由T-DNA插入引起,在F<sub>2</sub>代中取突变型植株和野生型植株各30株以HPT1(5'-GTTTATCGGCACTTTGCATCG-3'), HPT2(5'-GGAGCATATACGCCCGGAGT-3')为引物对选择标记基因HPT进行PCR扩增。15 μL 反应体系中包括20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, pH 8.8, 0.6 U Taq 酶, 0.17 mmol/L dNTPs, 0.33 μmol/L 引物, 100 ng 模板DNA。ABI 9600 PCR 仪上进行PCR 扩增,反应条件为:94 °C 下预变性4 min;94 °C 下 30s, 58 °C 下30s, 72 °C 下 1 min, 35 个循环;最后在72 °C 下延伸10 min,预期产物大小为600 bp。扩增产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色紫外灯下观察。

### 1.2.7 突变体抗潮霉素浸泡分析

取处于分蘖期的水稻突变体植株叶片,剪成2-5cm片段置于含潮霉素溶液的培养皿中,并使叶片和溶液充分接触,在12h光照/12h黑暗、26 °C 条件下培养,定期观察叶片变色情况,以判断其抗性水平。检测溶液为含0.5mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)及50mg/L潮霉素B的水溶液。

### 1.2.8 突变相关基因的初定位

在已公布的SSR标记中,选取均匀分布在12条染色体上的213对引物(Temnykh et al. 2001, McCouch et al. 2002),在两亲本日本晴和龙特普间进行多态性分析,结果发现98对引物的PCR产物在亲本间表现多态,将筛选到的98对多态性标记用于突变相关基因的初定位分析。引物由北京奥科生物公司合成。反应体系同上,条件为:94 °C 下预变性4 min;94 °C 下 30s,退火(退火温度随引物各异)30s,72 °C 下 1 min,30 个循环;72 °C 下延伸10 min,反应产物用8%垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染观察(萨母布鲁克等2002)。

### 1.2.9 精细定位标记设计

在国际水稻基因组计划公布的水稻全基因组序列信息RGP(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/index.html>)、NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gramene([http://www.gramene.org/genome\\_browser/index.html](http://www.gramene.org/genome_browser/index.html)),和中国华大基因研究中心完成的9311草图序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/oldblast/BLAST/Genome/PlantBlast.shtml?10>)基础上,Blast分析日本晴和9311间序列的差别,利用这些差异借助生物软件Primer Premier 5.0和DNAMAN设计引物,筛选有多态性的标记,精细定位突变相关基因。引物、PCR体系、产物分析同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体表型及遗传分析

在T-DNA插入转基因株系Fg10688的T1代中,发现了一些淡绿叶突变体,突变体叶片颜色在整个生育期均较野生型明显变淡,同时伴有半矮化、分蘖少、生育期延迟等性状(图1-1,表1-1)。根据表型我们将该突变体命名为*pgl2* (pale green leaf 2)。经统计,T1代50株植株中有38株野生型个体和12株突变型个体,野生型个体和突变型个体的分离符合3:1的分离假设( $\chi^2=0<\chi^2_{0.05}=3.84$ ),T1代突变体后代均表现为淡绿叶,并伴有半矮化、分蘖少、生育期延迟的性状,野生型单株收获播种,后代有2/3的株系发生性状分离,由此推断该突变可能是由单基因控制的隐性突变。用突变体和野生型籼稻品种龙特普杂交获得的F1植株均不表现突变表型,F2随机挑选300株个体进行突变体的遗传分析,结果发现有231株野生型个体和69株突变型个体,也符合3:1的分离假设( $\chi^2=0.537<\chi^2_{0.05}=3.84$ ),进一步证实了该突变是由单基因控制的隐性突变。

### 2.2 突变体与 T-DNA共分离分析

为了验证突变体是否由T-DNA插入引起的,潮霉素抗性实验被用于共分离分析。30株突变体,转基因和非转基因对照植株的叶片被浸泡于潮霉素溶液中,一个星期后,发现非转基因对照和7株突变体的叶片明显褐化,而剩下的23株突变体和转基因对照植株的叶片仍然保持绿色。这个结果暗示着突变性状不是由T-DNA插入引起的。

考虑到潮霉素磷酸转移酶基因在转基因植株中可能发生沉默这一事实,我们用PCR的方法检测潮霉素敏感的突变体是否含有潮霉素磷酸转移酶基因,结果显示所有潮霉素敏感突变体的DNA均不能扩增出潮霉素磷酸转移酶基因中的目的片段。(图1-2)潮霉素抗性实验和PCR检测实验的结果均说明突变体的产生和T-DNA插入无关,因此我们考虑用图位克隆法来克隆*PGL2*基因。

### 2.3 突变体光合参数的变化

突变体及非转基因野生型对照光合参数的测定结果表明(表1-1),突变体和野生型的叶绿素总量差异不大,但突变体中叶绿素a的含量减少,仅为对照的70%,而叶绿素b增加为对照的175%。在正常野生型对照中,叶绿素a/b的值为2.52,而突变体中叶绿素a/b则有较大幅度的降低,比值趋于1( $Chl\ a/Chl\ b=1.002$ )。虽然突变体叶色变淡,但净光合速率却达到23.16  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ,比野生型亲本提高了21%。



图 1-1 突变体 pgl2及其野生型亲本日本晴在苗期的表型

Fig.1-1. Phenotypes of the mutant pgl2 and wild type at seedling stage

表 1-1 突变体 pgl2的表型特征

Table1-1. Characterization of the mutant pgl2

| 材料<br>Material    | 株高<br>Plant height /cm | 播始历<br>期<br>Days to heading /d | 有效分<br>蘖<br>Effective tillers per plant | 叶绿素 a 含<br>量<br>Chl a content/mg g <sup>-1</sup> | 叶绿素 b 含<br>量<br>Chl b content/mg g <sup>-1</sup> | 叶绿素 a/叶<br>绿素 b<br>Chl a/Chl b | 叶绿素 a,b 总量<br>Chl a+ Chl b /mg g <sup>-1</sup> | 净光合速率<br>Net photosynthetic rate / mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |
|-------------------|------------------------|--------------------------------|---|--|--|--------------------------------|--|--|
| 突变体 pgl2          | 65.8±1.8               | 85±0                           | 5.7±0.2                                 | 1.66±0.001                                       | 1.66±0.001                                       | 1.00                           | 3.32   | 23.16±0.034  |
| 日本晴<br>Nipponbare | 93.3±4.4               | 68±0                           | 12±0.6                                  | 2.39±0.003                                       | 0.95±0.001                                       | 2.52                           | 3.34   | 19.18±0.549  |

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

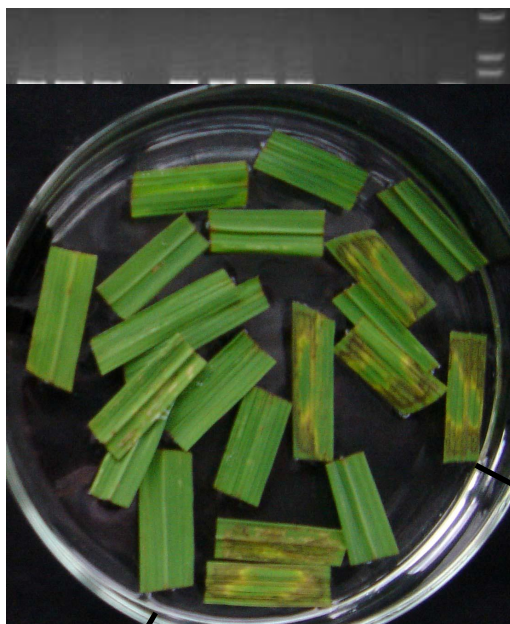


图 1-2 突变体 pgl2叶片的潮霉素片段

PCR扩增结果及潮霉素溶液浸泡结果

Fig.1-2. PCR analysis of mutant pgl2 and the result of hygromycin

resistance assay

1-12, 突变体单株; 13, Marker

1-12, mutants; 13, Marker

S: Sensitive; R: Resistant

S

R



不同温度条件下生长的突变体和非转基因野生型对照观察结果表明, 该突变体对温度钝感, 在5个不同温度条件下, 叶色无明显变化(资料未显示)。

## 2.4 PGL2基因的染色体定位

利用筛选到的98对多态性标记对21个F<sub>2</sub>的突变型单株进行初定位分析, 结果发现目的基因与第8染色体的标记RM331表现紧密连锁, 21个单株全部扩增出与日本晴对照相同的带型

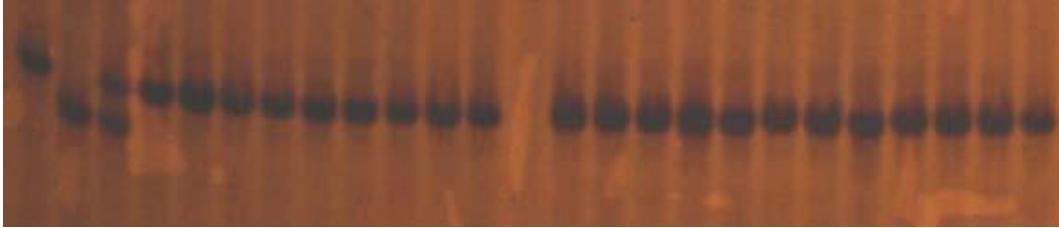


图 1-3 初定位结果中标记 RM331与 PGL2基因连锁

Fig1-3. SSR marker RM331 is linked with the *pgl2* locus in primary mapping.

1-日本晴; 2-龙特普; 3-F<sub>1</sub> (*pgl2*×龙特普); 4~24-F<sub>2</sub> 突变型单株。

1, Nipponbare; 2, Longtepu; 3, F<sub>1</sub> (*pgl2* Longtepu); 4-24, Mutant individuals in F<sub>2</sub> population

## 2.5 PGL2基因的精细定位

利用已公布的日本晴和9311序列, Blast分析其差别, 并近似认为这些差别在日本晴和另一籼稻品种龙特普间也存在, 借助生物软件Primer Premier 5.0和DNAMAN, 在RM331两边设计了49对INDEL引物, 经过两亲本间多态性筛选, 结果找到14对在日本晴和龙特普间有多态表现的分子标记(表1-2), 利用这些标记分析了384个F<sub>2</sub>突变型单株和4390个F<sub>3</sub>突变型单株。最后将PGL2基因定位于着丝粒附近分子标记PH72和PH78之间约2.37Mb的范围内, 其中在PH72侧有2个交换, PH78侧有1个交换。其他标记的交换数见图1-4。

## 3 讨论

有研究表明, 在水稻的12条染色体序列中, 第8染色体着丝粒区间的序列重复度相对最低, 荧光原位杂交(FISH)实验结果显示卫星重复序列的长度大约只有64 kb (Cheng et al. 2002)。通过利用水稻EST序列和着丝粒特异卫星序列构建酵母人工染色体跨叠克隆群, 进行染色体作图, Wu等认为, 第8染色体上着丝粒区间大约有2 Mb, 位于遗传图谱54.3 cM处(Wu et al. 2002)。Nagaki等在对1.65 Mb的序列分析后发现, 在此区间内存在有47个假设的基因, 其中14个存在于着丝粒的异染色质区, 而在这14个基因中至少有4个是功能基因, 这一结果改变了人们认为异染色质无功能基因的传统观点(Nagaki et al. 2004, Sun et al. 1997, Schueler et al. 2001, Hosouchi et al. 2002)。与此同时, Wu等也对第8染色体着丝粒区间的序列进行较为精细的序列测定及结构研究, 在他们研究的约1.97 Mb的区间内, 有201个开放阅读框架(ORF), 48个基因的序列有全长cDNA支持或其表达产物与已知蛋白有较高的同源性, 其中

在CentO重复簇附近（分别约为8kb，4kb）存在着两个假设的功能基因分别编码TGF-beta 互作受体蛋白和叶绿体前体缺陷蛋白（Wu et al. 2004）。虽然关于CEN8的研究已经很多，但是到目前为止CEN8区间究竟有多长，还没有被明确界定。

表 1-2 FGL2基因精细定位所用分子标记

Table 1-2. Markers used for fine mapping of the FGL2 gene

| 分子标记<br>Marker | 引物序列<br>Primer sequence                        | 物理距离<br>Physical distance /Mb |
|----------------|--|-------------------------------|
| PH87           | TCCCTGGTGTTACAATCAT<br>TGGCATCTCCGAATCAAAA     | 9.064                         |
| PH7-1          | GCAGGGAAAAAATACAGCA<br>ACTAGCAAAATTGAAAGCC     | 9.524                         |
| PH7-2          | TTGGATCGTCTCCCTCAA<br>CTCCCATGCCTTCTTCTC       | 10.950                        |
| PH72           | CAATAGTCAACCAAAGATAA<br>GAAAGAAAAGAAGGGAGATA   | 11.782                        |
| PH56           | TAAGATAGCCACTGATAAAGT<br>GAATATGTGAGAGTAAGCATG | 12.009                        |
| PH74           | GCACTGATTCTGTGGTGGTA<br>CTTCGTTAGCCTCATGTCTG   | 12.258                        |
| RM331          | GAACCAGAGGACAAAAATGC<br>CATCATACATTTGCAGCCAG   | 12.288                        |
| PH75           | AAGAAGCGGCAATTATAGACCC<br>CTGCAACCCTCAACCAAACG | 12.711                        |
| PH77           | AATGTTGCGGAAATATCTGG<br>GGCTTACTCGGTGATGATTG   | 13.809                        |
| PH78           | CAACAGTGAATCTGCATATTG<br>TTATGGATTTATGACCTGCTC | 14.153                        |
| PH79           | GAGCCCTATCTAGCGTCACTG<br>ATAGAAGCACCCGCCAATCGT | 14.412                        |
| PH80           | AGGAAATAATTGTCCATAAC<br>CAACTCAAAAGGTAAAACCTG  | 14.732                        |
| PH7-5          | CAAACCGCACTGCTCACT<br>AGGATGCACAGCCTACCG       | 15.098                        |
| PH7-6          | GGGAGCTGCTGCATCGTCA<br>CGCTGTTGGTTCGCTGTCTGTC  | 15.652                        |
| PH7-8          | ACCGAAGTAGGCCAAGAT<br>TTGAGAAAACCAGGGTGC       | 17.118                        |

注：以上序列及染色体位置信息均来自于 NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Note: Information comes from NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

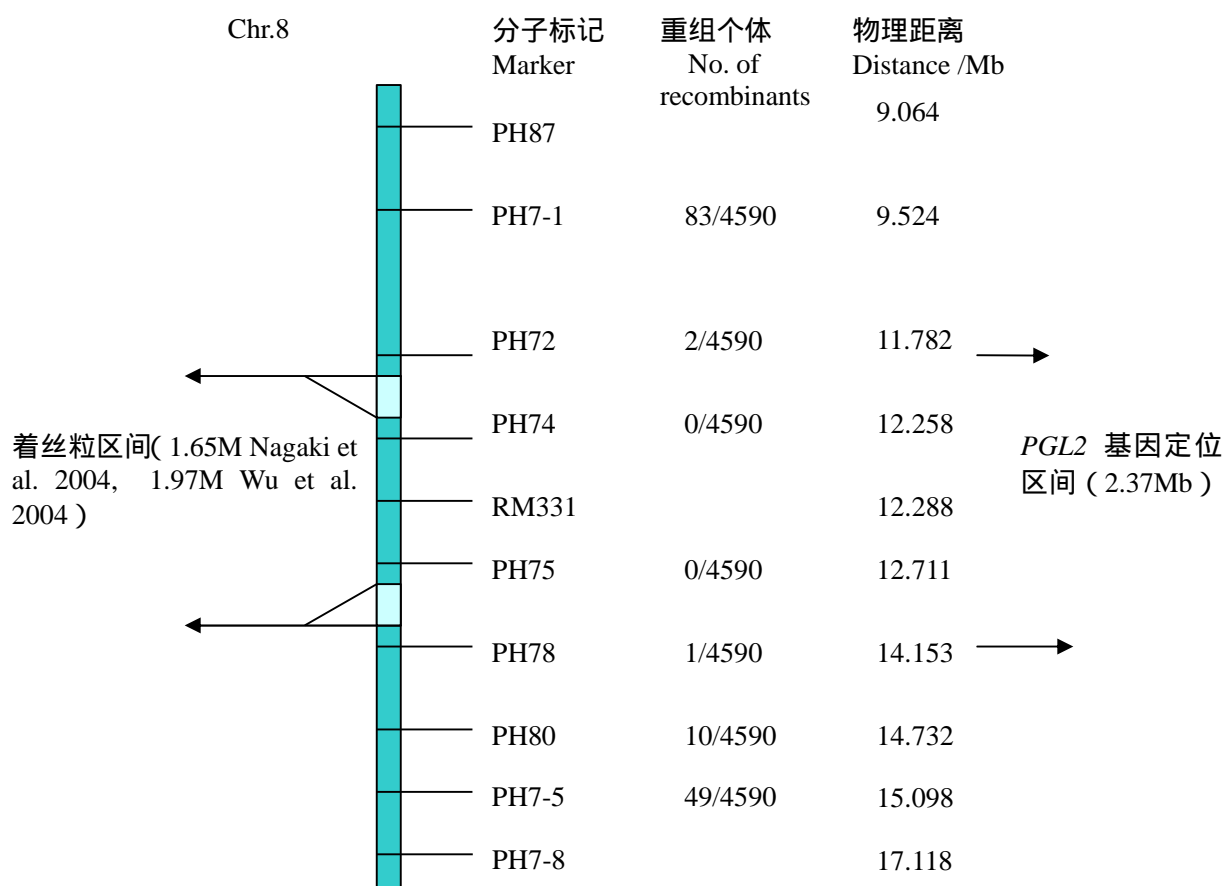


图 1-4 第 8 染色体上的 PGL2 基因物理图谱

Fig.1-4. Physical map around the pgl2 locus on chr.8

随着国际水稻基因组计划的圆满完成，利用图位克隆的方法克隆基因已经变得越来越快捷、高效，但是着丝粒区间序列的高度重复性，同源性不仅给序列的测定、拼接带来了困难，同时也极大地限制了分子标记的开发，在引物设计的过程中，经常会出现一对引物有多个匹配位点的情况，严重干扰了分子标记位置的确定，所以到目前为止克隆着丝粒区间的基因，仍然是一项极具挑战性的工作。本研究在初定位的基础上，利用自行开发设计的INDEL引物将PGL2基因定位于第8染色体着丝粒附近2.37 Mb的区间内，此结果为该基因的最终克隆提供了一个较为精细的候选区间，可以通过基因预测，大大减少后期基因测序和RNA干涉的工作量。在引物设计的过程中，我们的经验是尽量避免在水稻特异大片段重复的区间（如CEN0）设计引物，根据Nagaki等、Wu等对CEN8的分析结果（Nagaki et al. 2004, Wu et al. 2004），我们发现在预测的ORF中设计的引物多态率较高，而位于CEN0，TE，LTR等序列上的引物通常不容易得到多态表现。此外，INDEL引物的设计应尽量找两亲本间差别约在10~20个碱基的区段，太大或太小的差别所设计的引物多态率都较低。

PGL2基因的定位区间与Wu等测序区间的比较结果如图1-5，遗传距离均为54.3 cM（Wu et al. 2004）。根据精确测序和基因预测结果，在此区间，除了1.97 Mb内预测的48个假设基因外，其余6个BAC/PAC上预测的有cDNA全长支持的基因还有17个（表1-3）。在已有的预测结果中，由于候选基因较多，而且大多数的预测基因都编码未知蛋白或是假设蛋白，尚未发现有与叶绿素合成和降解途径有关的基因，所以PGL2基因功能还不能确定。

叶绿素合成过程比较明确,首先合成叶绿素a,再通过叶绿素a氧化酶的作用形成叶绿素b。叶绿素a氧化酶也能将叶绿酸a(chlorophyllide a)直接氧化为叶绿酸b(chlorophyllide b),然后再转化为叶绿素b。此外,在叶绿素b还原酶的作用下,叶绿素b也能转换为叶绿素a,叶绿素a氧化酶、叶绿素b还原酶和羟基叶绿素a还原酶共同调控叶绿素a和叶绿素b的比例(Eckhardt et al. 2004, Grossman et al. 2004)。由我们的实验结果可以看出,突变体和野生型的叶绿素总量差异不大,但突变体中Chl a/Chl b的比值趋近于1,这提示有更多的叶绿素a被转化为叶绿素b,因此,我们推测引发突变的基因可能与叶绿素a,b间的转化有关。但是,PGL2基因在水稻叶色变化过程中究竟起怎样的作用,还有待更为深入的研究来验证。pgl2突变体的发现、定位及候选基因的分析将有助于人们对CEN8上的基因在水稻生长、发育过程中的作用,以及在水稻进化中序列变化情况的了解。

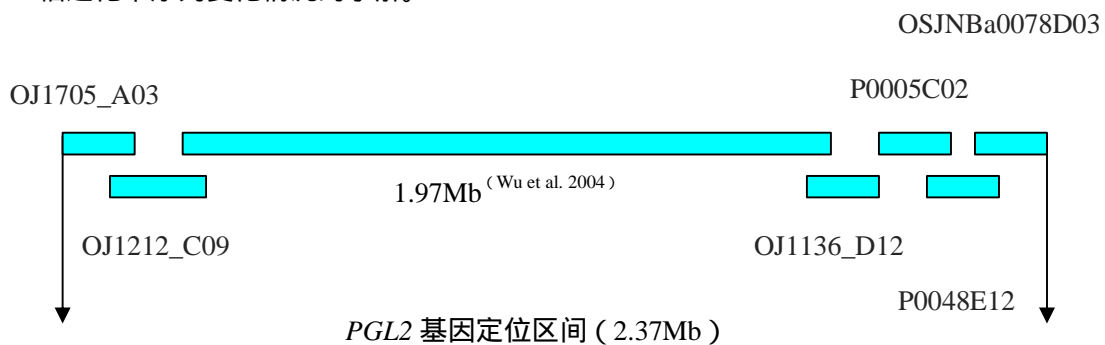


图 1-5 PGL2基因定位区间与现有精确测序的着丝粒区间位置比较  
 Fig.1-5. The PGL2 gene target region and reported centromeric region

表 1-3 *PGL2* 基因定位区间内其余六个 BAC/PAC 上的预测基因Table 1-3. Predicted genes in other six BAC/PAC clones in the *PGL2* gene target region

| BAC/PAC       | 功能预测(Predicted Function)   | cDNA     |
|---------------|--|----------|
| OJ1705_A03    | ATP结合蛋白  | AK073881 |
|               | putative ATP binding   |          |
|               | 未知蛋白   | AK069295 |
|               | unknown protein  |          |
|               | 未知蛋白   | AK062297 |
|               | unknown protein  |          |
|               | 苏氨酸- tRNA合成酶 (苏氨酸-tRNA 连接酶) (ThrRS)                                | AK070378 |
|               | putative Threonyl-tRNA synthetase (Threonine--tRNA ligase) (ThrRS) | AK059095 |
| OJ1212_C09    | NBS-LRR 抗病蛋白   | AK066438 |
|               | putative NBS-LRR disease resistance protein homologue              |          |
| OJ1136_D12    | 未知蛋白   | AK108030 |
|               | unknown protein similar to cyclase-like protein                    |          |
|               | 酪氨酸-tRNA合成酶  | AK101379 |
|               | putative Tyrosyl-tRNA synthetase                                   | AK101530 |
|               | RNA / 核酸结合蛋白   | AK121802 |
|               | putative RNA binding / nucleic acid binding                        | AK104999 |
|               | ATOPT1; 多肽转运蛋白   | AK121257 |
|               | putative ATOPT1; oligopeptide transporter                          |          |
|               | 未知蛋白   | AK069354 |
|               | unknown protein  |          |
| P0005C02      | 未知蛋白   | AK099426 |
|               | unknown protein similar to endoribonuclease E-like protein         | AK059447 |
|               | 未知蛋白   | AK107815 |
|               | unknown protein  |          |
|               | 类似于成束蛋白的阿拉伯半乳聚糖蛋白1   | AK068096 |
|               | putative FLA1 (fascilin-like arabinogalactan-protein 1)            | AK104404 |
| P0048E12      | 未知蛋白   | AK120116 |
|               | unknown protein similar to porin-like protein                      |          |
|               | ATPPT1; 异戊烯转移酶   | AK069839 |
|               | putative ATPPT1; prenyltransferase                                 |          |
|               | 未知蛋白   | AK064573 |
|               | unknown protein similar to signal recognition particle 68K protein |          |
| OSJNBa0078D03 | 参与电子转运和金属离子结合的蛋白   | AK068722 |
|               | putative electron transporter/ metal ion binding                   | AK104226 |

注：以上数据信息均来自于 <http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/index.html>

Note: Information comes from <http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/index.html>

## 第二章 一个温敏型水稻黄绿叶突变相关基因的精细定位与功能研究

摘要：在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中，发现了一个以日本晴为遗传背景的温度敏感型黄绿叶突变体 $ypgll(t)$  (*yellow pale green leaf 1, temporally*)。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。潮霉素PCR扩增结果显示，该突变并非由T-DNA插入引起。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交，构建F2群体对突变基因进行精细定位。初定位结果显示目的基因与第7染色体SSR标记RM11连锁度较高，根据初定位的结果在设计RM11附近进一步发展了22对INDEL标记，将突变基因进一步定位于INDEL标记YT6132和YT614之间10.3kb的序列内，该区间有两个预测基因均编码未知蛋白，测序结果显示 $Ypgll(t)$  (KOME Accession No. AK062845) 基因发生54个碱基的缺失突变，利用生物信息学工具，根据基因结构进行功能预测，结果显示该基因编码一个介导蛋白互作的锚蛋白。RT-PCR证明突变体中 $Ypgll(t)$ 仍可正常表达。突变体与野生型电镜观察显示前者叶绿体发育异常，嗜锶滴大量集聚。温控试验结果表明，该突变体在 30 的温度条件生长时，表现为明显的黄叶表型，但当温度 33 时则转变为淡绿色。突变体叶绿素a、b的含量均大幅减少，24 时，叶绿素b减幅大于叶绿素a，造成叶绿素a/b比值达到19.2，随着温度上升叶绿素b快速增加，33 以后叶绿素a/b比值基本趋于正常（3左右），野生型叶绿素a、b的含量和a/b比值变化不大。

关键词：图位克隆；温度敏感型黄绿叶突变体；锚蛋白

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 植物材料

我们在本实验室构建的以籼稻品种 (*Oryza sativa* L ssp. *japonica*) 日本晴为遗传背景的T-DNA插入突变体库中发现了一个温度敏感型黄绿叶突变体，对T0代植株单株收种，T1 代种子播种于试验田，观察突变体表型。2004年夏以突变体为母本，籼稻品种龙特普为父本杂交，构建群体。2005年初在海南种植F1代，种子全部播种，自交后单株收种。2005年夏杭州种植F2代分离群体，统计突变型个体与野生型个体的分离比。

##### 1.1.2 质粒

干涉载体主骨架来自于TaKaRa公司pANDA35HK质粒（见图2-1）。

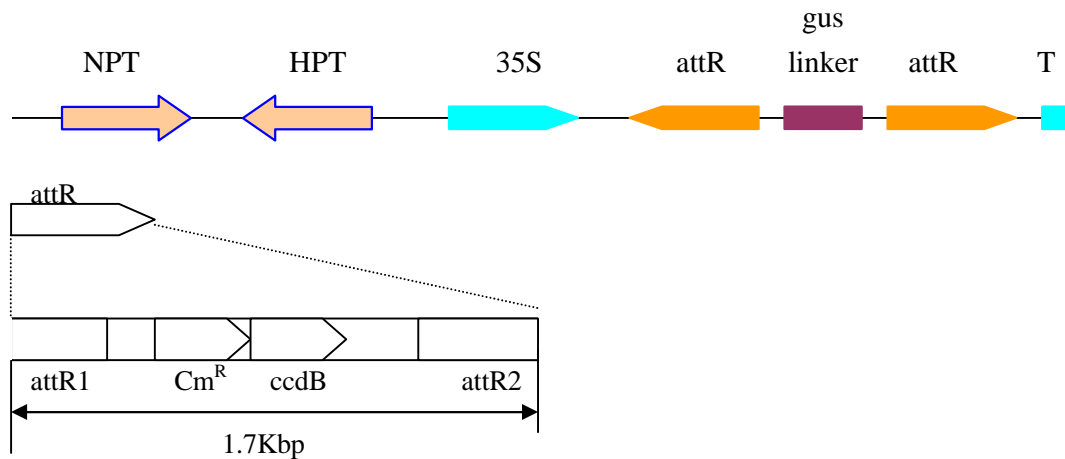


图 2-1 RNA干涉载体主骨架 pANDA35HK的 T-DNA区段

Fig 2-1 T-DNA region of RNAi vector pANDA35HK

### 1.1.3 菌株

大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$

根癌农杆菌菌株 EHA105

### 1.1.4 主要分子生物学试剂、化学试剂和仪器

见附录。

## 1.2 方法

### 1.2.1 水稻总 RNA的提取

参照上海生工生物工程有限公司RNA提取试剂盒操作说明稍加修改提取水稻总RNA。具体步骤如下：

- Ø 称取100 mg左右材料于研钵中，在液氮迅速下研磨成粉末；
- Ø 1.5ml离心管收集粉末，加入50  $\mu$ l 预热的450  $\mu$ l RLT提取缓冲液，涡旋混匀；
- Ø 加0.5倍体积的无水乙醇，温和混匀；
- Ø 12000rpm离心2min，弃杂质，取上清；
- Ø 将上清液转入EZ spin柱（套放在2ml收集管上）中，12000rpm离心2min，弃废液；
- Ø 加500  $\mu$ l RW缓冲液到EZ spin柱，12000rpm离心1min，弃收集管；
- Ø 将柱子转移到一新的1.5ml收集管上，向柱子中加入500  $\mu$ l RPE缓冲液，12000rpm离心1min，弃废液；
- Ø 将柱子转移到一新的1.5ml收集管中，12000rpm再次离心1min，弃废液；
- Ø 最后转移柱子到新的1.5ml收集管，在柱子中央50  $\mu$ l RNase-free水，50  $^{\circ}$ C温育2min，12000rpm离心1min；

Ø 1% 甲醛变性胶电泳检测RNA的完整性。

### 1.2.2 RT-PCR检测

所得RNA样品用RNase-free的Dnase于37℃下消化30 min，消化体系包括：40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>，1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>，1 U RQ1 RNase-Free DNase，300 ng 模板total RNA。然后加1 μL RQ1 DNase Stop Solution(20 mmol/L EGTA pH 8.0) 于65℃下10 min，终止反应。RQ1 RNase-Free DNase消化后的RNA样品进行反转录反应，反应体系包括：5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3，50 mmol/L KCl，1 mmol/L each dNTP Mixture，10 U RNase Inhibitor，2.5 U AMV Reverse Transcriptase，2.5 pmol/μL Random 9 mers，120 ng total RNA模板。按如下条件反应：30℃下10 min；42℃下30 min；99℃下5 min；5℃下5 min。反转录产物进行PCR扩增，50 μL反应体系包括：5 μL PCR buffer 10 μL(TaKaRa) Ex Taq™ HS，0.33 μmol/L Primer，反转录cDNA第一链反应产物 5 μL(约60 ng)。ABI 9600 PCR 仪上进行PCR 扩增，反应条件为：94℃下预变性4 min；94℃下30s，退火(退火温度随引物各异)30s，72℃下1 min，40个循环；最后在72℃下延伸10 min。扩增产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳分离，溴化乙锭染色紫外灯下观察。

### 1.2.3 野生型与突变体叶绿体的电镜观察

Ø 分别取野生型与突变体新鲜剑叶叶片，用双面刀片切成1 mm×3 mm 小片；  
 Ø 2.5%戊二醛 (pH 7.3-7.4) 4℃下预固定过夜 (固定时抽真空使叶片下沉)；  
 Ø 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 7.0) 漂洗3次，每次15 min，然后用1%四氧化锇后固定2 h；  
 Ø 0.1 mol/L PB (pH7.0) 漂洗，乙醇系列脱水，Spurr'低粘度环氧树脂渗透和包埋，70℃聚合；  
 Ø 包埋材料在Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机上切片，用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色，在日本电子JEOL 公司的JEM-1230 透射电镜下观察叶绿体细胞；  
 Ø 加速电压为80 kV，用Gatan公司782 型CCD 相机记录图像。

### 1.2.4 野生型和突变体叶绿素 a b, 类胡萝卜素的测定

以突变体和非转基因对照生长20 d的幼苗新鲜叶片为材料，取0.1~0.5 g，剪成1 cm左右的片段浸泡于10mL 80%的丙酮溶液中，在26℃的黑暗条件下浸泡48 h。用分光光度计在470 nm, 645 nm和 663 nm三个波长下测量溶液的光密度，两次重复。按照Arnon等 (1949) 的方法计算叶片的总叶绿素 (Chl, chlorophyll)、叶绿素a (Chl a) 和叶绿素b (Chl b) 的含量。根据Wellburn 的方法计算叶片类胡萝卜素的含量(Wellburn 1994)，公式如下：

$$\begin{aligned} \text{chl } a &= (12.7D_{663} - 2.69D_{645}) \quad V/W \\ \text{chl } b &= (22.9D_{645} - 4.68D_{663}) \quad V/W \\ \text{car} &= (1000D_{470} \quad V/W - 3.27\text{chl } a - 104\text{chl } b) / 198 \end{aligned}$$



### 1.2.5 野生型与突变体叶片石蜡切片观察

石蜡切片制作步骤如下：叶片在FAA中固定后作如下处理

- ∅ 脱水：经70%、85%、95%、100%、100%各级酒精处理脱水至纯酒精；
- ∅ 透明：经1/2纯酒精+1/2二甲苯至纯二甲苯每级停留2-6小时，在酒精、二甲苯各半时，加入少许番红干粉，给材料着色，使其石蜡中可见；
- ∅ 浸蜡：在装有材料的纯二甲苯中，加入纯石蜡粉。其具体方法为：用单面刀片刮取石蜡屑，加入量以先少后多为宜，一般分2-3次加入，每加一次后放回恒温箱，控制在38-40℃之间，使石蜡融化包埋；
- ∅ 包埋：包埋之前，准备一个镊子，一盆冷水，酒精灯及火柴，放在温箱旁。然后准备包埋用的纸盒，纸盒必须用较硬而光滑的纸折成。纸盒的大小可根据材料的大小及多少而定。包埋用的纸盒折叠成小船型。包埋时将融化的石蜡连同材料一起倾于纸盒内，然后将镊子或解剖针在酒精灯上烧热，迅速把材料按需要的切面排列整齐。然后平平放入冷水中，使其很快凝固；
- ∅ 切片：切片时，把切片刀和刀架装好，再把小木块夹在固着装置上，调整固着装置，使材料的切面与切片刀口平行，材料的纵轴必须与刀口垂直，否则切片不正。调整厚度标志器，使所指刻度正适合所要厚度，然后左手持毛笔，右手转动切片机进行切片；
- ∅ 粘片：将彻底洗净的载玻片涂上一小滴粘帖剂。将粘帖剂用小指涂匀，然后加几滴3%福尔马林或蒸馏水，用针或解剖刀轻轻将蜡片放在液面上。然后将带有蜡片的载玻片放在温台上。蜡片受热后，即慢慢伸直。完全伸直后，即用解剖针把材料在载玻片上的位置放好，再用吸水纸将多余的水吸去，放在温台上表面烤干。可放于30℃温箱中一昼夜加速其干燥；
- ∅ 脱蜡：将切片放于纯二甲苯中5-10分钟，脱去材料周围的蜡，若镜检时发现蜡未脱干净可重复；
- ∅ 镜检拍照

### 1.2.6 DNA片断的回收

本研究采用QIAGEN公司的QIAquick Gel Extraction Kit从胶中回收目的片段。操作如下：

- ∅ DNA酶切产物电泳后，用一干净锋利刀片从凝胶割取目的片段带；
- ∅ 加入3倍胶体积的QG缓冲液；
- ∅ 50℃ 10min以溶解凝胶；
- ∅ 加入1倍胶体积的异丙醇，混匀；
- ∅ 将以上样品转至QIAquick离心柱，离心柱置于2ml收集管上，12000rpm 离心1min；
- ∅ 弃去滤过液，加0.5ml QG缓冲液于离心柱中，离心1min；
- ∅ 用0.75ml PE缓冲液洗柱，室温静置5min，12000rpm离心1min，除去滤过液；
- ∅ 12000rpm再离心1次以彻底去除PE缓冲液；
- ∅ 加入20μl ddH<sub>2</sub>O溶解DNA，37℃ 静置10min后，14000rpm离心1min，收集滤液即为DNA片段溶液，取适量溶液电泳，估计其浓度。

### 1.2.7 连接反应

连接反应体系如下：

| 连接反应体系             | 加入量              |
|--------------------|------------------|
| 线性载体DNA            | 20ng             |
| 外源片断               | 200ng            |
| 10 连接缓冲液           | 2 $\mu$ l        |
| T4 DNA ligase      | 1 $\mu$ l ( 5u ) |
| ddH <sub>2</sub> O | to 20 $\mu$ l    |

在1.5ml Eppendorf离心管中依次加入上述成分以后，离心混匀，于16℃连接过夜，65℃灭活10min。

### 1.2.8 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态制备 ( CaCl<sub>2</sub>法 ) 及转化 ( 热击法 )

- Ø 取DH5 $\alpha$ 单菌落接种于5ml LB液体培养基中，37℃，250rpm振荡培养过夜；
- Ø 1：100转接菌液于500ml LB液体培养基，37℃，250rpm振荡培养过夜3h；
- Ø 冰浴10min后，4000rpm，4℃ 10min离心收集菌体；
- Ø 弃上清，加入冰预冷的0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>重悬沉淀；
- Ø 4000rpm，4℃ 10min离心收集菌体，弃上清，加入冰预冷的0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>再次重悬沉淀；
- Ø 菌液冰浴30min，其间不时晃动，保证菌体降温均匀；
- Ø 4000rpm，4℃ 10min离心收集菌体；
- Ø 加入30%甘油和0.2mol.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>重悬菌体，150 $\mu$ l/管分装于1.5ml冰冷的无菌离心管，迅速液氮冷冻，-80℃超低温冰箱保存；
- Ø 取1管感受态细胞，手握融化，加入连接产物冰浴30min；
- Ø 热击90s，迅速放入冰中，加入800 $\mu$ l SOC；
- Ø 37℃，250rpm振荡培养1h后涂含有相应抗生素的平板；
- Ø 平板37℃，培养16h，挑单克隆，鉴定阳性重组子。

### 1.2.9 碱裂解法提取质粒

- Ø 取培养好的携带质粒 DNA 的菌液 1.5ml，4℃ 10000rpm 离心 2min，弃上清，将离心管倒置使上清液全部流尽；
- Ø 用 100 $\mu$ l 溶液充分悬浮菌体细胞；
- Ø 加入 200 $\mu$ l 新配制的溶液，盖紧管盖，缓缓地颠倒离心管数次，以充分混匀内容物，冰浴 10min；
- Ø 加 300 $\mu$ l 预冷的溶液，摇动离心管数次以混匀内容物，冰上放置 15min，此时应形成白色

絮状沉淀；

- Ø 4℃下 10000rpm 离心 10min，取上清液；
- Ø 加入等体积的饱和酚/氯仿（1:1），振荡混匀，4℃下 12000rpm 离心 10min；
- Ø 取上层水相，加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇，-20℃ 放置 30min。4℃下 12000rpm 离心 20min，去上清，沉淀用冰冷的 70%乙醇洗涤；
- Ø 沉淀真空抽干，溶于 20μl TE 或水中。

#### 1.2.10 农杆菌感受态细胞的制备（热击）

- Ø 取农杆菌单菌落接种于 5ml 含有 20mg/ml 利福平的 YM 液体培养基中，28℃，140rpm 振荡培养过夜；
- Ø 2ml 菌液转入 50ml YM 培养基中继续振荡培养至  $OD_{600} = 0.5$ ；
- Ø 将菌液转入无菌离心管，4℃下 4000rpm 离心 8min 收集菌体；
- Ø 菌体用 5ml 预冷的 TE（pH7.5）洗一次，加入 5ml 新鲜的 YM 培养基重新悬浮；
- Ø 200μl/管分装于 1.5ml Eppendorf 管中，用液氮迅速冷冻后，-80℃超低温冰箱保存；

#### 1.2.11 植物表达载体导入农杆菌感受态细胞

- Ø 取农杆菌感受态细胞室温解冻以后，加入 1μg 质粒 DNA，混匀；
- Ø 依次于冰浴、液氮和 37℃水浴中各置 5min；
- Ø 加入 800μl 新鲜的 YM 培养基，于 28℃振荡培养 4h；
- Ø 取 200μl 涂布于含相应抗生素（50mg/L）的 YM 培养基上，28℃培养 2-3 天。

#### 1.2.12 农杆菌转化水稻

基因转化方法参照 Hiei 等的方法并加以修改。取开花后 12~15d 左右的稻穗脱粒，表面灭菌后接种在 NB 培养基上，26℃下暗培养诱导愈伤组织。约 5~7d 后取愈伤组织在相同条件下继代培养，用于共培养。农杆菌于含 50 mg/L 卡那霉素(Kan)的 YM 平板上划线，28℃下黑暗培养 3d，用金属匙收集农杆菌菌体，将其悬浮于共培养 CM 液体培养基中，调整菌体浓度至  $OD_{600}$  为 0.3~0.5，加入乙酰丁香酮（AS，终浓度为 100 μmol/L），即为共培养转化水稻用的农杆菌悬浮液。将继代培养 4d 后的愈伤组织浸于此菌液中，20min 后取出并用无菌滤纸吸去多余菌液，随即转入铺有无菌滤纸的固体培养基上，于 26℃下暗培养 2~3d。共培养后的愈伤组织在含 50mg/L 潮霉素的筛选培养基上，26℃下暗培养 14d，再转到新鲜配制的筛选培养基上继续筛选 14d。然后选择生长旺盛的抗性愈伤组织转移到含有 50mg/L 潮霉素的分化培养基上，暗培养 3d 后转至 15h/d 光照条件下培养，再生的小苗在 1/2MS 上生根壮苗两周左右。选择高约 10cm、根系发达的小苗，按编号移栽入土。

本研究所涉及的其他试验方法请见第一章

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体表型

2004年夏在播种于中国水稻所富阳基地农场的T-DNA插入转基因株系V1257的T1代中,发现了一个黄绿叶突变体,在T1代群体中,突变体表现为:苗期(5月中下旬到6月下旬温度偏低)叶片亮黄色(图2-2C),营养生长期(7月初到8月底)随着温度的升高,叶片颜色逐渐转变为淡绿色,同时伴有半矮化性状,但分蘖数与对照差异不大(图2-2A),生殖生长期(9月初)突变体抽穗明显晚于对照,从播种到抽穗生长时间可达92天。由于9月以后温度开始回落,在突然降温的条件下,突变体会出现原有叶片淡绿色,新生叶片黄色的情况(图2-2B)。在海南陵水试验场连续三年播种突变体,苗期仍表现黄叶性状,且颜色更为鲜艳,偏向于橙色,但插秧后迅速死亡,无法完成全生育期(表2-1)。

为了确定突变体颜色变化的温度临界值,我们将突变体和野生型对照植株分别播种于相同光周期和光密度,但不同温度(24°C-36°C)的温度梯度培养箱中。当突变体生长温度30°C时可以清楚地观察到突变体表现为黄叶表型,然而当突变体生长温度上升到33°C时,突变体则表现为淡绿色(图2-3)。根据表型我们将该突变体命名为 $ypgl1(t)$ (*yellow pale green leaf 1, temporally*)。

### 2.2 突变体的遗传学分析

经统计,突变株系V1257的T1代群体78株植株中,有57株野生型个体和21株突变型个体,野生型和突变型的分离符合3:1的分离假设( $\chi^2=0.154 < \chi^2_{0.05}=3.84$ )。T1代突变体后代表型遗传稳定,野生型单株收获播种,后代有2/3的株系发生性状分离,由此推断该突变可能是由单基因控制的隐性突变。

用突变体和野生型籼稻品种龙特普杂交获得的F1植株均不表现突变表型,随机挑选300株F2代个体用于突变体的遗传分析,有216株野生型个体和84株突变型个体F2群体同样也符合3:1的分离假设( $\chi^2=1.44 < \chi^2_{0.05}=3.84$ ),进一步证实该突变是由单基因控制的隐性突变。

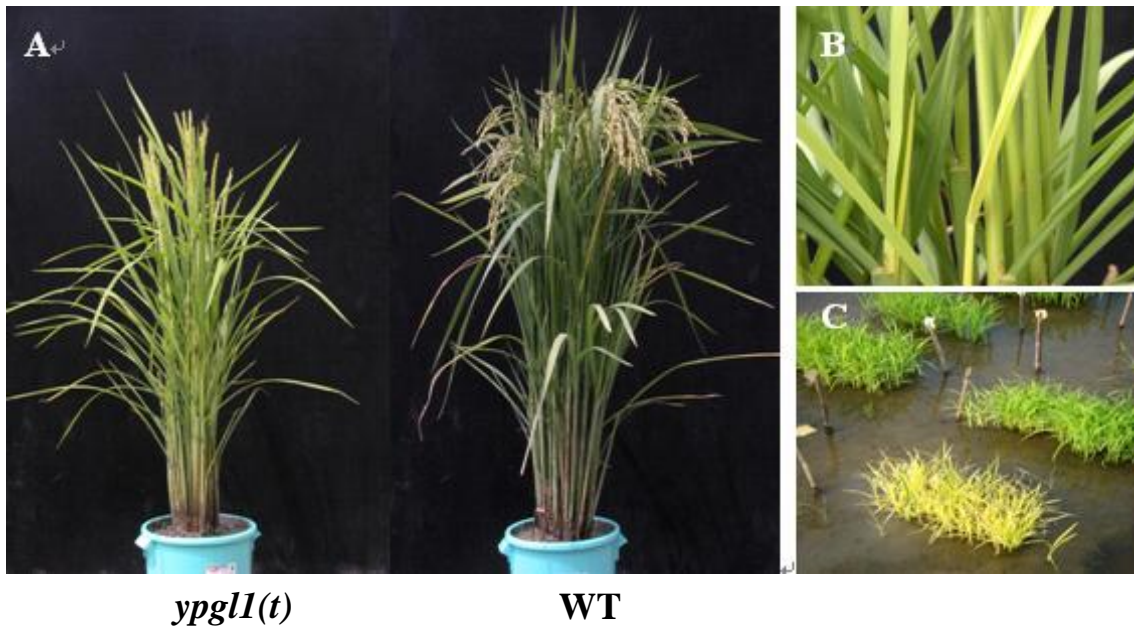


图 2-2 突变体 *ypg11(t)* 及其野生型亲本日本晴的表型

Fig.2-2. Phenotypes of the mutant *ypg11(t)* and the wild type at heading stage

A : 突变体 *ypg11(t)* 及其野生型亲本日本晴在抽穗期的表型 ; B : 突变体 *ypg11(t)* 在突遇降温时的表型 ; C : 突变体 *ypg11(t)* 苗期田间的表型

A: Phenotypes of the mutant *ypg11(t)* and the wild type at heading stage; B: Phenotypes of the mutant *ypg11(t)* at heading stage after temperature lowering sharply ; C: Phenotypes of the mutant *ypg11(t)* at seeding stage in paddy field

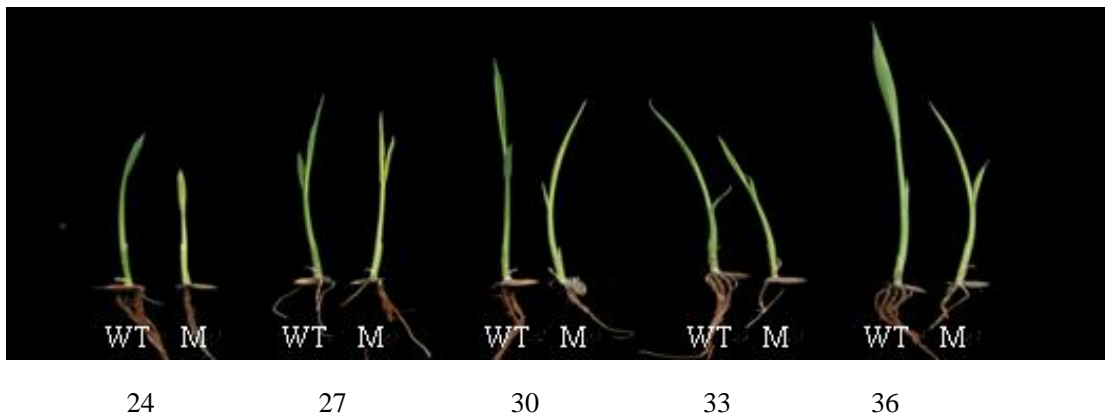


图 2-3 在不同的生长温度下，发芽后生长 7d 的野生型和 *ypg11(t)* 突变体植株的表型

Fig 2-3 Phenotypes of wild type (WT) and the *ypg11(t)* mutant (M) grown for 7 d after germination under different temperatures

表 2-1 突变体 *ypg11(t)* 的表型特征

Table2-1. Characterization of the mutant *ypg11(t)*

| 材料<br>Material      | 株高<br>Plant height<br>/cm | 播始历期<br>Days to heading<br>/d | 有效分蘖<br>Effective tillers<br>per plant |
|---------------------|---------------------------|-------------------------------|--|
| 突变体 <i>ypg11(t)</i> | 72.8±0.6                  | 92±0                          | 11±0.6                                 |
| 日本晴 Nipponbare      | 93.3±4.4                  | 68±0                          | 12±0.6                                 |

### 2.3 突变体与 T-DNA共分离分析

在F2群体中取突变型植株和野生型植株各30株，分别进行选择标记基因HPT的PCR扩增及潮霉素溶液浸泡，结果显示该突变性状与T-DNA各自独立分离，不存在共分离关系，表明该突变不是由插入引起。

### 2.4 突变体不同温度下叶绿素、类胡萝卜素含量的变化

突变体及非转基因野生型对照在不同温度条件下叶绿素含量的测定结果表明（表2-2），突变体叶绿素总量明显少于野生型。叶绿素a/b比值随温度的升高，由24℃的19.21逐渐降低，类胡萝卜素含量在低温情况下高于对照，33℃以后二者均与野生型对照基本一致，但叶绿素总含量仍低于野生型。

### 2.5 不同温度条件下突变体与野生型叶绿体电镜观察及叶片切片观察

嗜锻滴的主要成分是亲脂性的醌类物质，在叶绿体中起脂类仓库的作用。当叶绿体发育正常，片层合成需要脂类时，便从嗜锻滴调用，嗜锻滴减少，通过同化作用产生淀粉粒；反之片层合成受阻，嗜锻滴就会大量集聚，伴随光能利用率降低，淀粉粒合成减少甚至停止。不同温度下生长的突变体与野生型叶片取样，电镜下观察叶绿体形态。如图2-4所示，24℃时突变体细胞中几乎没有可见的淀粉粒，且嗜锻滴数目增加大量集聚；33℃时叶绿体中出现了淀粉粒，且嗜锻滴数目较24℃有所减少，但仍多于野生型对照；在两种温度条件下对照叶绿体中淀粉粒和嗜锻滴数目变化不大。因此我们认为目的基因的突变造成植物叶绿体发育异常，但是随着温度的升高，突变对植物的影响有减弱的趋势，但不会完全被温度补偿。石蜡切片观察结果显示，不同温度条件下突变体与对照在主脉、侧脉形态、侧脉间距方面均无明显差异（资料未显示）。

表 2-2 不同的生长温度下，发芽后生长 10d 的 *ypg11(t)* 突变体和野生型叶绿素、类胡萝卜素的含量 [mg/g]

Table 2-2 Chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb) and carotenoid contents [mg/g] in *ypg11(t)* mutant and wild type cultivar Nipponbare grown for 10 d after germination under different temperatures

| 材料                     | 色素                          | 环境温度 (°C)                       |       |       |        |        |
|------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------|-------|--------|--------|
|                        |                             | Temperature of environment (°C) |       |       |        |        |
| Material               | Pigment                     | 36                              | 33    | 30    | 27     | 24     |
| 突变体<br><i>ypg11(t)</i> | Chl <i>a</i>                | 0.170                           | 0.190 | 0.221 | 0.229  | 0.186  |
|                        | Chl <i>b</i>                | 0.068                           | 0.062 | 0.047 | 0.013  | 0.010  |
|                        | Chl <i>a</i> +Chl <i>b</i>  | 0.237                           | 0.256 | 0.268 | 0.240  | 0.195  |
|                        | Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i> | 2.513                           | 3.147 | 4.702 | 17.880 | 19.210 |
|                        | Caro                        | 0.100                           | 0.196 | 0.349 | 0.496  | 0.676  |
| 野生型<br>日本晴             | Chl <i>a</i>                | 0.528                           | 0.901 | 1.281 | 1.477  | 1.548  |
|                        | Chl <i>b</i>                | 0.238                           | 0.355 | 0.509 | 0.688  | 0.590  |
|                        | Chl <i>a</i> +Chl <i>b</i>  | 0.765                           | 1.256 | 1.790 | 2.165  | 2.137  |
|                        | Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i> | 2.232                           | 2.550 | 2.529 | 2.157  | 2.636  |
|                        | Caro                        | 0.098                           | 0.158 | 0.239 | 0.265  | 0.278  |

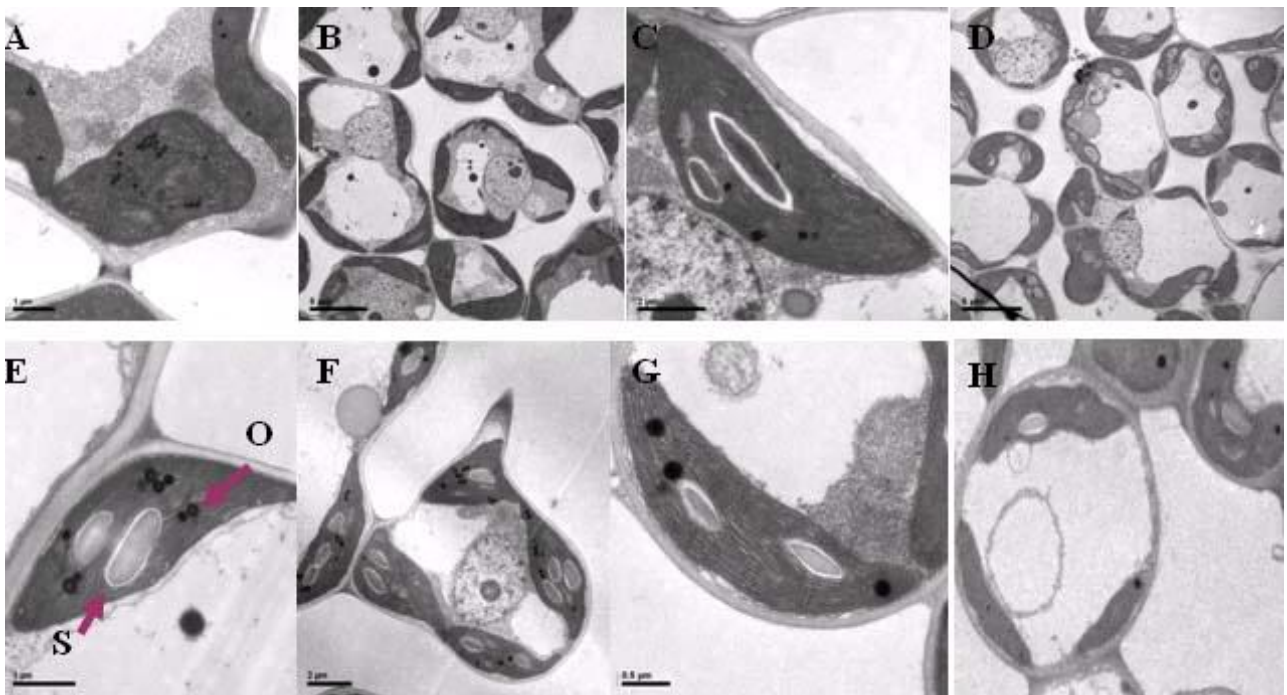


图 2-4 不同温度条件下突变体与野生型叶绿体电镜观察

Fig2-4 Electron microscopic analysis of the *ypg11(t)* mutant and wild-type chloroplasts at different temperature

A, B 为 24 温度条件下突变体；C, D 为 24 温度条件下野生型对照；E, F 为 33 温度条件下突变体；G, H 为 33 温度条件下野生型对照；S 为淀粉颗粒；O 为嗜锇颗粒

A and B are sections of *ypg11(t)* mutant chloroplasts at 24 ; C and D are sections of wild-type chloroplasts at 24 ; E and F are sections of *ypg11(t)* mutant chloroplasts at 33 ; G and H are sections of wild-type chloroplasts at 33 ; S, starch granule; O, osmiophilic droplet

## 2.6 *Ypg11(t)*基因的初定位分析

利用筛选到的98对多态性标记对21个F<sub>2</sub>的突变型单株进行初定位分析,结果发现第7染色体的SSR标记RM11与目的基因连锁度较高,21个单株中有2个单交换,其余19个均扩增出与日本晴对照相同的带型(图2-5A),这说明突变相关基因 $Ypg11(t)$ 与标记RM11在同一染色体上。

## 2.7 *Ypg11(t)*基因的精细定位

利用已公布的日本晴和9311序列,Blast分析其差别,并近似认为这些差别在日本晴和另一籼稻品种龙特普间也存在,借助生物软件Primer Premier 5.0和DNAMAN,在RM11两边设计了53对SSR和INDEL引物,经过两亲本间多态性筛选,结果找到22对在日本晴和龙特普间

有多态表现的分子标记(表2-3)。在初定位的基础上,利用新设计的分子标记进一步分析,将 $Ypgl1(t)$ 基因定位于标记YT6-1和YT6-4之间。用INDEL标记YT6-1和YT6-12筛选了420个F<sub>2</sub>突变型单株和4719个F<sub>3</sub>突变型单株(图2-5B,C)。最后将 $Ypgl1(t)$ 基因定位于分子标记YT6132和YT614之间约10.3kb的范围内,其中在YT6132侧有3个交换, YT614侧有1个交换。其他标记的交换数见图2-6。

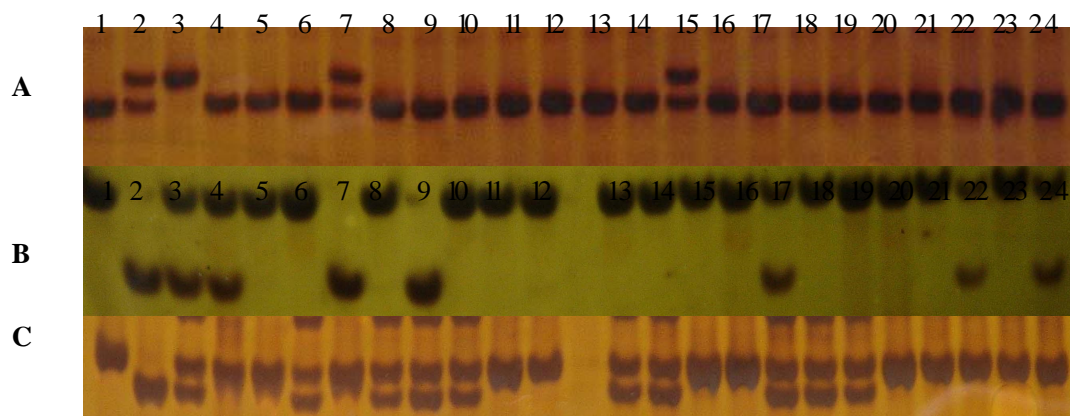


图 2-5 与  $Ypgl1(t)$  基因连锁的分子标记和筛选  $Ypgl1(t)$  基因和分子标记间发生交换的重组个体

A: 初定位中发现 RM1 和  $Ypgl1(t)$  基因连锁

B, C: INDEL 分子标记 YT6-1 和 YT6-12 被用于筛选重组个体

1: 日本晴; 2: 龙特普; 3: F<sub>1</sub>( $Ypgl1(t)$  龙特普); 4-24: F<sub>2</sub> 代的突变型个体;

Fig 2-5 Screening for  $Ypgl1(t)$ -linked markers and identification of recombinants between the  $Ypgl1(t)$  locus and molecular markers

A: The SSR marker RM1 is linked with the  $Ypgl1(t)$  locus in primary mapping. B, C: The InDels

marker YT6-1 and YT6-12 are employed for identification of recombinants 1: Nipponbare; 2:

Longtepu; 3: F<sub>1</sub>( $Ypgl1(t)$  Longtepu); 4-24: mutant individuals of F<sub>2</sub> population



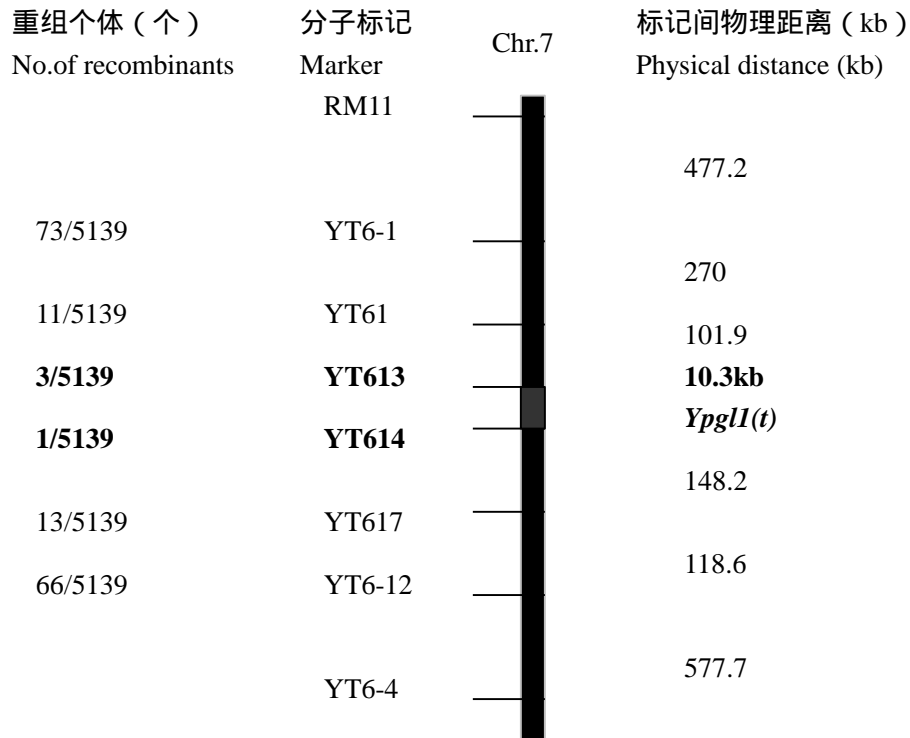


图 2-6 第 7 染色体与 *Ypg11(t)* 基因连锁的 SSR 和 INDEL 分子标记在水稻遗传连锁图谱上的位置, 以及目的基因区域的高密度物理图谱

IRGSP 的图位序列估算分子标记间的物理距离, 黑色矩形为候选基因所在的区域

Fig 2-6 A high resolution physical map around the *Ypg11(t)* locus on chromosome 7, and the rice genetic linkage map of SSR, INDEL markers *Ypg11(t)*-linked

Physical distance was calculated from the map-based sequence published by IRGSP (IRGSP 2005). The black rectangle indicates the candidate region for the *Ypg11(t)* gene

## 2.8 *Ypg11(t)* 定位区间的候选基因及突变基因的测序

利用网络资源, 参照水稻基因功能自动注释系统 (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/rgadb/>), 我们发现在 *Ypg11(t)* 定位的 10.3kb 区间内有两个候选基因: 1, Gene No. OJ1657\_A07.AutoPredgene07, 包括两个外显子, 基因组长度为 1261bp, 全长 cDNA 克隆 AK062845 支持, 转录长度为 519bp; 2, Gene No. OJ1657\_A07.Predgene03, 包括 18 个外显子, 基因组长度 7434bp, 全长 cDNA 克隆 AK120277 支持, 转录长度为 4230bp; 二者均编码未知蛋白, 后者编码产物类似于一种不依赖  $\text{Ca}^{2+}$  的磷脂酶 A2 (calcium-independent phospholipase A2)。为了确定真正的突变基因并明确其突变方式, 我们设计了 12 对测序引物 (表 2-4), 以突变体基因组为模板进行 PCR 扩增, 产物回收后连到 T-Vector 上, 进行测序, 每个反应 3 次重复。测序结果表明 Gene No. OJ1657\_A07.AutoPredgene07 为突变体相关基因, 我们将其命名为 *OsYpg11(t)* 基因。该基因发生缺失突变, 在 cDNA 编码区缺失 54 个碱基 (图 2-7A), 对应缺失 18 个氨基酸, 读码框没有发生变化 (图 2-7B)。将该基因 cDNA 克隆 AK062845

表 2-3 Ypg1(t)基因定位所用分子标记

Table 2-3. Markers used for mapping of the Ypg1(t) gene

| 分子标记<br>Marker | 引物序列<br>Primer sequence                                    | 退火温度 ( )<br>Annealing<br>temperature ( ) | 物理距离 ( bp )<br>Physical distance ( bp) |
|----------------|--|--|--|
| RM11           | 5'- TCTCCTCTTCCCCGATC-3'<br>5'- ATAGCGGGCGAGGCTTAG-3'      | 50                                       | 19204328                               |
| YT6-2          | 5'-GGGGATAACACAAATGAG-3'<br>5'-ACCGTGCTAGAATAAGAA-3'       | 50                                       | 19247433                               |
| YT6-1          | 5'-GCTCCCATATATATACACAT-3'<br>5'-GTTGAGATTAATTAGCTGTC-3'   | 55                                       | 19681513                               |
| YT61           | 5'-ACGGGGACATTAATCTGT-3'<br>5'-TTCTTGACTTCGCACCAAC-3'      | 46                                       | 19951393                               |
| YT613          | 5'-TCTCCCCTCACCCCTTCATC-3'<br>5'-CTCTGCACTGCACTCCACCA-3'   | 55                                       | 20053249                               |
| YT6132         | 5'-GTGATACTTGGTTATTCCT-3'<br>5'-TCTGATACCCAGTAGAAAT-3'     | 46                                       | 20058677                               |
| YT6131         | 5'-TCCCAGTGATGAAAGAGC-3'<br>5'-GGTACATATTCAATCTCCCTAA-3'   | 48                                       | 20067066                               |
| YT614          | 5'-GCCTCCTGACCACCCGCATCT-3'<br>5'-GGCTCCAGTCCCAGCTCATGG-3' | 63                                       | 20068977                               |
| YT621          | 5'-GATTGGTTCATTTCCCTC-3'<br>5'-TTGGTACTTCATCGGTAG-3'       | 46                                       | 20076452                               |
| YT622          | 5'-CCAATTTATGCTGCAATCT-3'<br>5'-TTTTCTCAGCATGTCCTTG-3'     | 50                                       | 20095902                               |
| YT615          | 5'-AGGTACTCCAAGGACATCA- 3'<br>5'-CTTTTGAGTCGTTGGGTTT- 3'   | 49                                       | 20099014                               |
| YT623          | 5'-CTTGGAGGAGACAAACACC-3'<br>5'-GAAGAAGGTCACGGGATAA-3'     | 50                                       | 20135707                               |
| YT624          | 5'-GGAGGTAATATCTGAACAT-3'<br>5'-CTACAACAGCCATCTAAAA-3'     | 44                                       | 20135777                               |
| YT625          | 5'-TCCAGATTTCCCTGGTATA-3'<br>5'-TAGCAGGTTTCTTTTGTT-3'      | 45                                       | 20137995                               |
| YT627          | 5'-AGTCGGCAGAACACCTAG-3'<br>5'-GGGCACGCTGATCTTCAC-3'       | 50                                       | 20186226                               |
| YT616          | 5'-GACCGCCTCGACCAGTAAG-3'<br>5'-GCAAGTGGATCAACTATAAACCC-3' | 52                                       | 20152236                               |
| YT630          | 5' GAAAAGTAATGCGGTGCC--3'<br>5'-TCATAAATGGAGGGGTC-3'       | 49                                       | 20186226                               |
| YT617          | 5'-CGTCCACCGATTACGTGCTC-3'<br>5'-TGCCAAGTAAGTGTATTGATT-3'  | 47                                       | 20217197                               |

| 分子标记<br>Marker | 引物序列<br>Primer sequence                               | 退火温度 ( )<br>Annealing<br>temperature ( ) | 物理距离 ( bp )<br>Physical distance ( bp) |
|----------------|---|--|--|
| YT6-13         | 5'-AAACAAGAAAGGGAGGAT-3'<br>5'-AAAGTTAGCGAGAGAAGC-3'  | 50                                       | 20035778                               |
| YT6-12         | 5'-AGGGAGGATGATGTGACC-3'<br>5'-CCTGATGCGTATGAAAGT-3'  | 50                                       | 20335787                               |
| YT6-16         | 5'-GGGACTGAAAAATGCTGT-3'<br>5'-GGATCTGATTCTCGAAGC-3'  | 50                                       | 20678718                               |
| YT6-4          | 5'-CAAGTACAGAAAAGGGCA-3'<br>5'-ATTAGAGGGCAACATCAA-3'  | 50                                       | 20913474                               |
| YT6-6          | 5'-TCCATTTTTTGTCCCTCGC-3'<br>5'-CTTGTTTCAATAGTTCGG-3' | 50                                       | 21526010                               |

注：以上序列及染色体位置信息均来自于 NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Note: Information comes from NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

表 2-4 OsYpg11(t) 基因测序所用引物

Table 2-4. Primers used for sequencing of the OsYpg11(t) gene

| 测序引物<br>Primer<br>name | 引物序列<br>Primer sequence                                      | 退火温度 ( )<br>Annealing<br>temperature ( ) | OJ1657_A07克隆中的对<br>应位置 ( bp )<br>Corresponding position of<br>primers in BAC<br>OJ1657_A07 (bp) |
|------------------------|--|--|---|
| ssg1                   | 5'-CACTTCCGAATGAAACAATA-3'<br>5'-TACTCCATCCCTCCGTA AAA-3'    | 52                                       | 22904-24306   |
| ssg2                   | 5'-AAAACCAACGGATGTGACCC-3'<br>5'-AATAAGCGAAGCAAGCGAAA-3'     | 54                                       | 24169-25303   |
| ssg3                   | 5'-TCGCTTGCTTCGCTTATTCC-3'<br>5'-TTTCGTTGTTGAGGCTGTGG-3'     | 54                                       | 25286-26438   |
| ssg4                   | 5'-ACCACAGCCTCAACAACGAA-3'<br>5'-GACAGTGCCTGCTGCTCATA-3'     | 52                                       | 26418-27560   |
| ssg5                   | 5'-TTGGCAGCAATTAGAGTATGT-3'<br>5'-ACCTTAGGATGGAGGCGTGT-3'    | 52                                       | 27123-28434   |
| ssg6                   | 5'-CCAATTCTTTGGGTGCCCTCT-3'<br>5'-CTCTGCTTGCCCTCCTCTGT-3'    | 52                                       | 28181-29553   |
| ssg7                   | 5'-ACATGGATTGCCCATTTGCTT-3'<br>5'-TTCCGAAATTACCAGTTTG-3'     | 52                                       | 29482-30425   |
| ssg8                   | 5'-CAGCAGTTCCAACCGTGTTA-3'<br>5'-GAGGCAAGATGATCTGGATTTA-3'   | 52                                       | 30137-31461   |
| ssg9                   | 5'-AGTGCATGAGGGTGCACGAG-3'<br>5'-CGCCCATTACTGGATTTACAGTTA-3' | 54                                       | 31300-32383   |
| ssg10                  | 5'-TAACAATGCAGGATAGTTTACC-3'<br>5'-ATGCTACGACCACTGAAGAT-3'   | 50                                       | 32093-33084   |

| 测序引物<br>Primer<br>name | 引物序列<br>Primer sequence  | 退火温度 ( )<br>Annealing<br>temperature ( ) | OJ1657_A07克隆中的对<br>应位置 ( bp )<br>Corresponding position of<br>primers in BAC |
|------------------------|--|--|--|
| ssg11                  | 526 GCTTGTAGTACTTCAACTACATGAGGAAATGCTTGGCTGTGGAGGACCTTACGACAAAGATGA                    |  | OJ1657_A07 (bp)  |
| ssg12                  | 446 AGR<br>TCTTGAACCAAGGACATCCACCCGCTGGACATCTCTCTCATGCTTCGCGCCTCCGAGGGCGACAAGCCCAAGCTC |  | 25672-25673  |
| 注：以上序                  |  |  |  |
| Note: Inform           | 526 AGRGACAAAG   |  |  |
| o                      | 25732-25733  |  |  |
|                        | ATGGGGATGCTGGCGGTGGAGGGCACCTACGACAAGATGGAGGCGCTGCTGAACCAGGAC                           |  |  |
|                        | METGlyMETLeuAlaValGluGlyThrTyrAspLysMETGluAlaLeuLeuAsnGlnAsp                           |  |  |
|                        | ATGGGGATGCTGGCGGTGGAGGGCACCTACGACAAGATGGAGGCGCTGCTGAACCAGGAC                           |  |  |
|                        | METGlyMETLeuAlaValGluGlyThrTyrAspLysMETGluAlaLeuLeuAsnGlnAsp                           |  |  |
| <b>A</b>               | ATCCACCCGGTGGACATCCTCCTCATGCTCGCCGCCTCCGAGGGCGACAAGCCCAAGCTC                           |  |  |
|                        | IleHisProValAspIleLeuLeuMETLeuAlaAlaSerGluGlyAspLysProLysLeu                           |  |  |
|                        | ATCCACCCGGTGGACATCCTCCTCATGCTCGCCGCCTCCGAGGGCGACAAGCCCAAGCTC                           |  |  |
|                        | IleHisProValAspIleLeuLeuMETLeuAlaAlaSerGluGlyAspLysProLysLeu                           |  |  |
|                        | GAGGAGCTCCTCCGCGCCGCGCCAAAGTACGACGTCAAGGACGTCGACGGCCGGACGGCG                           |  |  |
|                        | GluGluLeuLeuArgAlaGlyAlaLysTyrAspValLysAspValAspGlyArgThrAla                           |  |  |
|                        | GAGGAGCTCCTCCGCGCC   |  |  |
|                        | GluGluLeuLeuArgAla   |  |  |
|                        | CTCGACCGCGCCGCGACGACACCAGGGAGTTCATCCTCGGCTTCGCGCCACCTTGGCC                             |  |  |
|                        | LeuAspArgAlaAlaAspAspThrArgGluPheIleLeuGlyPheAlaAlaThrLeuAla                           |  |  |
| <b>B</b>               | GCCGACGACACCAGGGAGTTCATCCTCGGCTTCGCGCCACCTTGGCC  |  |  |
|                        | AlaAspAspThrArgGluPheIleLeuGlyPheAlaAlaThrLeuAla                                       |  |  |
|                        | GCCTGA   |  |  |
|                        | Ala***   |  |  |
|                        | GCCTGA   |  |  |
|                        | Ala***   |  |  |

图 2-7 OsYpg1(t)基因突变位点

Fig 2-7 The mutation of OsYpg1(t)

A 基因序列比对 ; B 氨基酸序列比对

A The Blast of sequence; B The Blast of amino acid

表 2-5 RT-PCR分析及 RNA干涉载体目的片断扩增所用引物

Table 2-5 Primers of RT-PCR and RNAi vector construction

|      | 引物序列<br>Primer sequence                                     | 退火温度 ( )<br>Annealing<br>temperature ( ) | 产物大小 ( bp )<br>Product sizes |      |
|------|---|--|------------------------------|------|
|      |   |  | 基因组                          | cDNA |
| SOEP | 5'-AGATCTAGGGCAGGGACGAC-3'<br>5'-ATTTCTACAAAGCTAGCCTCACA-3' | 58                                       | 1250                         | 531  |
| SRP  | 5'-CACCTACGACAAGATGGAGGC-3'<br>5'-CGGCGAAGCCGAGGATGAA-3'    | 62                                       | 214                          | 214  |

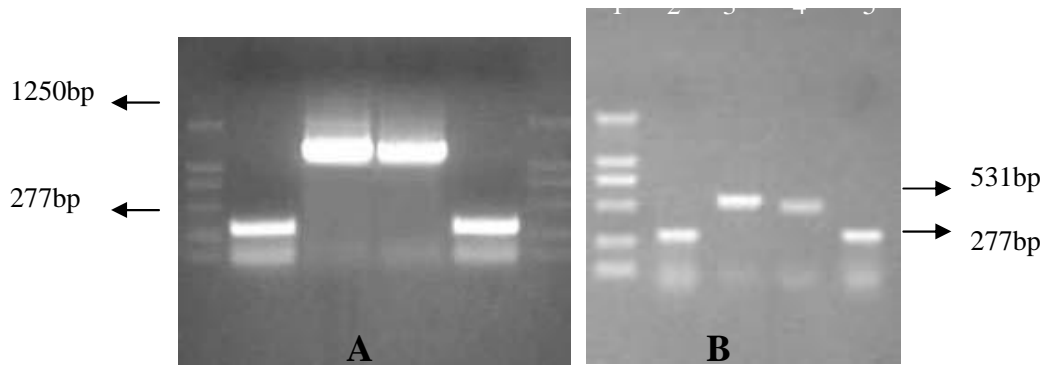


图 2-8 *OsYpgl1(t)*基因在野生型对照和突变体基因组、cDNA中的 PCR RT-PCR分析

Fig. 2-8 PCR analysis *OsYpgl1(t)* of genome in wide type and mutant. RT-PCR analysis *OsYpgl1(t)* of cDNA in wide type and mutant

A: *OsYpgl1(t)*基因在野生型对照和突变体基因组中的 PCR 扩增，对照中目的片断的大小为 1250bp

1, 6: DL2000 ( TaKaRa ); 2, 5: 野生型和突变体基因组内参 SPS 扩增; 3, 4: 野生型和突变体基因组 SOEP 扩增

B: *OsYpgl1(t)*基因在野生型对照和突变体中的 RT-PCR 分析，对照中目的片断的大小为 531bp

1: DL2000 ( TaKaRa ); 2, 4: 野生型和突变体 cDNA 内参 SPS 扩增; 3, 4: 野生型和突变体 cDNASOEP 扩增

A: PCR analysis of *OsYpgl1(t)* in genome of wide type and mutant. MW of product is 1250bp in genome of wide type  
1, 6: DL2000(TaKaRa); 2, 5: SPS analysis of genome of wide type and mutant; 3, 4: SOEP analysis of genome of wide type and mutant

在 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST\\_PROGRAMS=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on) 中搜索后，我们发现该基因编码产物被定位于细胞质中，与叶绿体发育相关，一次跨膜。用其编码的氨基酸序列在 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Protein&list\\_uids=125558552&dopt=GenPept](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Protein&list_uids=125558552&dopt=GenPept)

## 2.9 *OsYpgl1(t)*基因的 RT-PCR分析

基因序列发生突变后引起一系列的突变表型，有可能是由于目的基因沉默，不再编码产

物，也可能是改变了表达方式，编码新的蛋白。为了验证*OsYpgll(t)*基因在突变体中是否发生沉默，或是产生新的转录产物，我们设计了RT-PCR试验，从RNA水平上验证目的基因是否正常转录。根据*OsYpgll(t)*基因cDNA序列两端，设计引物SOEP1和SOEP2（表2-5）。提取突变体及野生型对照的叶片总RNA，反转录为cDNA。用SOEP和水稻内参SPS为引物，分别扩增突变体、野生型的基因组及cDNA（图2-8），电泳结果显示：SOEP在野生型叶片基因组中的扩增大小为1250bp，突变体产物略小。RNA反转录为cDNA后扩增结果则可以清晰的反映野生型与突变体间的差异。基因转录后，内含子被剪切掉，所以野生型扩增产物就变为531bp，而突变体大小为477bp。这说明*OsYpgll(t)*基因的突变虽然引起了表型的变化，但该基因的转录是正常的，即没有发生沉默，而是转录生成了新的产物，从而影响植物的代谢发育，造成温敏型的黄绿叶突变

## 2.10 构建 *OsYpgll(t)*基因的干涉载体验证功能

以*OsYpgll(t)*基因cDNA序列为模板，设计引物SRP扩增目的基因5'端214bp的片段（表2-5），参照pENTR Directional TOPO Cloning Kits及Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) 试剂盒说明，在设计引物时5'端引物前加 CACC 四个碱基。目的片段扩增后，连T测序，序列正确即按图2-9流程构建RNA干涉载体pANDA183-SRP。

干涉载体构建好后，连接反应液转化大肠杆菌DH5<sup>+</sup>，挑取单克隆，提取质粒，对质粒进行酶切和PCR鉴定。将鉴定正确的干涉载体pANDA183-SRP重组子质粒转化农杆菌菌株EHA105，菌落PCR鉴定，结果证明干涉载体pANDA-183-SRP被成功转化到农杆菌菌株EHA105中。pANDA183-SRP农杆菌重组子转化水稻，现已进入重组愈伤分化阶段。

## 3 讨论

在高等植物的类囊体膜上排列着两种光合色素，叶绿素和类胡萝卜素。众所周知，叶绿素是植物进行光合作用的主要色素，但是叶绿素较易被破坏和降解，而类胡萝卜素则相对稳定，同时后者也有收集和传递光能的作用，除此之外类胡萝卜素还有一个重要的功能，那就是吸收多余的光能，使叶绿素免受的伤害。秋天、衰老或生长异常的叶片，叶绿素被破坏或降解，数量减少，类胡萝卜素含量相对增加，所以叶片呈黄色（潘瑞炽等2004）。在本研究中，叶绿素及类胡萝卜素含量测定结果表明，叶绿素含量远低于对照，类胡萝卜素的含量却高于对照，这是突变体表现为黄叶的直接原因。但是，如果仅仅是由于叶绿素的减少，引起黄叶，类胡萝卜素的含量应该与对照没有大的差异。为了解释突变体在海南陵水连种三年均不能完成正常生育过程，2006年四月初我们在实验室播种突变体，正常管理条件下到五月初突变体全部死亡，而野生型虽然长势弱，但仍然存活，这与突变体在海南的表现一致，所以我们推测苗期持续低温抑制叶绿素的合成，由于叶绿素的大幅减少，植物机体出于一种自我防御机制，增加类胡萝卜素的合成量，以吸收多余的光能，进行光保护，保证植株顺利完成整个生理过程。但随着种子贮存能量的减少，光合作用不能产生足够植株生长所需要的能量物质，合成更多的类胡萝卜素（突变体表现为颜色更加鲜艳，趋向与橙色）也无法缓解光损伤时，

植株就不能顺利完成生育期，导致在海南陵水突变体插秧后迅速死亡。

一般来说，叶绿素形成的最低温度是 2-4℃，最适温度为 30℃，最高温度为 40℃，秋天叶子变黄和早春寒潮过后水稻秧苗变白等现象都说明，低温抑制叶绿素的合成(潘瑞炽等 2004)。本研究所涉及的是一个温敏型的突变体，在 30℃ 以下时，表现为黄叶，33℃ 以上时则逐渐转为淡绿，颜色变化的临界温度在 30℃ - 33℃ 之间。这说明一种可能是目的基因本身对温度敏感，另一种可能是目的基因的突变对叶绿素合成的影响可能位于低温抑制靶物质(简称蛋白 A)的下游，而 *OsYpgl1(t)* 基因编码产物正是和蛋白 A 的下游产物结合介导后续的叶绿素合成反应。低温情况下蛋白 A 被抑制，不能正常合成其下游物质，叶绿素合成受阻，叶片表现为黄色；当温度升高到合成的最适温度后，蛋白 A 的抑制被解除，但是 *OsYpgl1(t)* 基因的突变则仍使叶绿素的合成不能完全恢复正常，表现为淡绿色，也就是说 *OsYpgl1(t)* 基因的突变所引起的真正表型应该是淡绿叶突变。温敏型的黄叶表型只是目的基因与温度互作的结果。

通过氨基酸序列的比对，我们发现 *OsYpgl1(t)* 基因的编码产物中包含锚蛋白重复序列。锚蛋白在细胞中的作用是介导蛋白与蛋白互作，参与信号转导、发育调控、物质运输等生长发育过程。*OsYpgl1(t)* 基因编码产物的部分序列 LMLAASEGDKPKLEELLRAGAKYDVKDVDRGRTALDRAA 被预测为锚蛋白重复序列，其中灰色标示的序列恰好是本研究所证实的缺失突变区。RT-PCR 试验结果表明，在突变体中目的基因序列发生突变后，并没有引起基因的沉默，而是正常转录的。这说明，突变表型的出现不是由于目的基因没有编码蛋白，而是可能改变了表达方式，编码新的蛋白。结合氨基酸序列的比对结果，我们可以推测 18 个氨基酸的缺失引起表型突变的可能机制为：锚蛋白序列的缺失，使突变体中 *OsYpgl1(t)* 基因的编码产物结构发生变化，虽然仍可以结合上游蛋白，使叶绿素的合成不致完全停止，但是原有蛋白的构象变化或是新产生的蛋白所能介导的叶绿素合成效率降低，最终引起淡绿叶的突变表型。如果将锚蛋白介导的叶绿素合成过程比做信号的级联传导，那么 *OsYpgl1(t)* 基因的突变就可以被认为是降低了信号的传导效率，减少了下游的反应量。虽然 RT-PCR 可以反映目的基因的转录情况，但是在转录水平上所获取的基因表达信息并不足以揭示该基因在细胞内的确切功能，所以我们正在构建 GUS 表达载体，期望在蛋白水平检测其表达的组织特异性。RNA 干涉载体的构建及转化，会产生目的基因的沉默效应，观察其表型变化，可能会为突变机理进一步明确提供有益的线索。由于锚蛋白功能复杂，不同的序列重复度及与其相连的其他功能域的不同都会产生完全不同的生理学效应，例如 Zhang 等发现了一种类固醇受体激发子，编码锚蛋白，在细胞中调节转录因子活性 (Zhang et al. 2007)。而其他一些研究又证实锚蛋白通过与 F-box、U-box、环指结构域等序列相连，在植物细胞中起泛素连接酶的作用 (Nodz-on et al. 2004, Huang et al. 2006, Wang et al. 2006)。因此，虽然近年来关于锚蛋白的研究很多，但它在细胞中究竟如何起作用，到目前为止还没有详细的机理阐述。

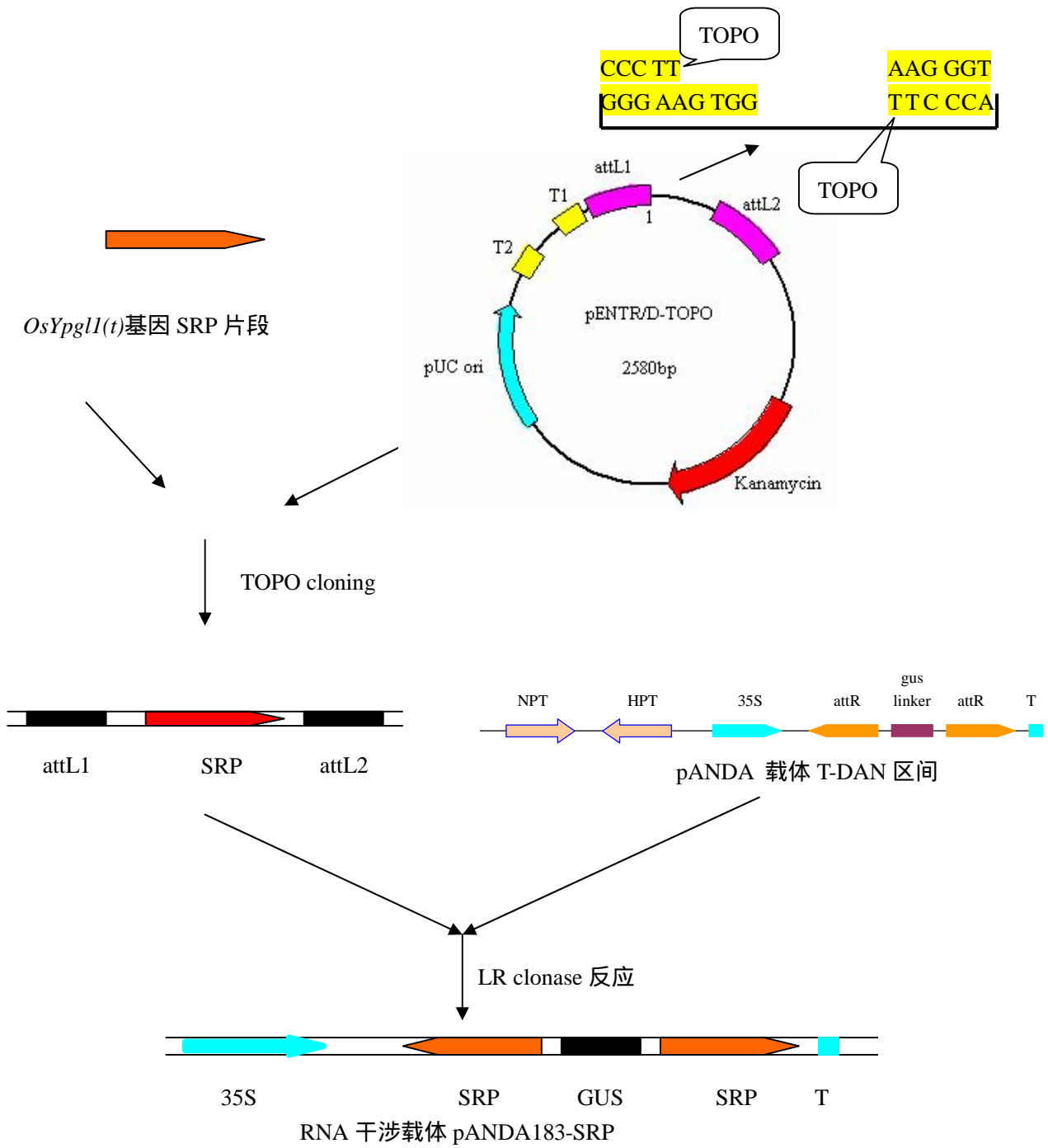


图 2-9 RNA干涉载体的构建流程图

Fig 2-9 Procedure of RNAi vector construction



## 第三章 水稻斑点叶突变相关基因的精细定位与功能研究

摘要：泛素结合酶E2催化泛素分子从E1半胱氨酸残基转移给E2活化的半胱氨酸位点，进而通过相同的基序与E3连接，将泛素分子通过E3最终结合到靶蛋白上，成为蛋白特异降解的标记。泛素化途径是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径。在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中，发现了一个以日本晴为遗传背景的斑点叶突变体*spl19* (*spotted leaf 19*)，该突变从三叶期开始出现小的铁锈斑点，随着新叶片的生长，老叶片斑点逐步扩大直至叶尖部分黄化枯死，衰老表现明显早于对照。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。潮霉素PCR扩增结果显示，该突变并非由T-DNA插入引起。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交，构建F2群体对突变基因进行定位。经过初定位、精细定位，最后将突变基因定位于INDEL标记PSE55和PSE62之间67.5kb的序列内，该区间有13个预测基因，其中有两个编码泛素结合酶。测序结果显示*Spl19*基因内部插入一段来自于第7染色体Tos17上约4.1kb的序列，RT-PCR结果表明突变体中插入位点前的目的基因序列仍然发生转录，插入位点后的序列无转录产物。利用生物信息学工具，根据基因结构预测功能发现，该基因可能编码一个介导蛋白特异性降解的泛素结合酶。

关键词：图位克隆；斑点叶突变体；泛素结合酶

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 植物材料

斑点叶突变体*spl19*来自于在本实验室构建的以粳稻品种(*Oryza sativa* L ssp. *japonica*)日本晴为遗传背景的T-DNA插入突变体库。定位F2群体来自于突变体和籼稻品种龙特普杂交的杂交后代。F3群体为F2代中野生型表型个体的自交后代。T0代、F1代植株单株收种，T1代、F2代播种于试验田，用于观察突变体表型并统计突变型个体与野生型个体的分离比。

##### 1.1.2 主要分子生物学试剂、化学试剂和仪器

见附录。

#### 1.2 方法

方法参见研究报告第一、二章

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体表型

在T-DNA插入突变体库中发现一个斑点叶突变体VKT1897。该突变体在T1代的表现为：3叶期开始，老叶叶尖首先出现小的铁锈色斑点，随着新叶的不断抽出，突变体一直保持除新叶外，老叶全部表现斑点性状，随着时间的推移，斑点数越来越多，直至叶尖处连成一片，然后黄化枯死（图3-1A, B）；突变体还伴有半矮，分蘖少，抽穗期略有提前性状（图3-1C）（表3-1）。根据表型我们将该突变体命名为*spl19* (*spotted leaf 19*)。

### 2.2 突变体的遗传学分析

在突变株系VKT1897的T1代群体55株植株中，有36株野生型个体和19株突变型个体，野生型个体和突变型个体的分离符合3:1的分离假设 ( $\chi^2=2.39 < \chi^2_{0.05}=3.84$ )。T1代突变体后代代表型遗传稳定，野生型单株收获播种，后代有2/3的株系发生性状分离，由此推断该突变可能是由单基因控制的隐性突变。

用突变体和野生型籼稻品种龙特普杂交获得的F1植株均不表现突变表型，随机挑选300株F2代个体用于突变体的遗传分析，有212株野生型个体和88株突变型个体，也符合3:1的分离假设 ( $\chi^2=3.104 < \chi^2_{0.05}=3.84$ )，进一步证实了该突变是由单基因控制的隐性突变。

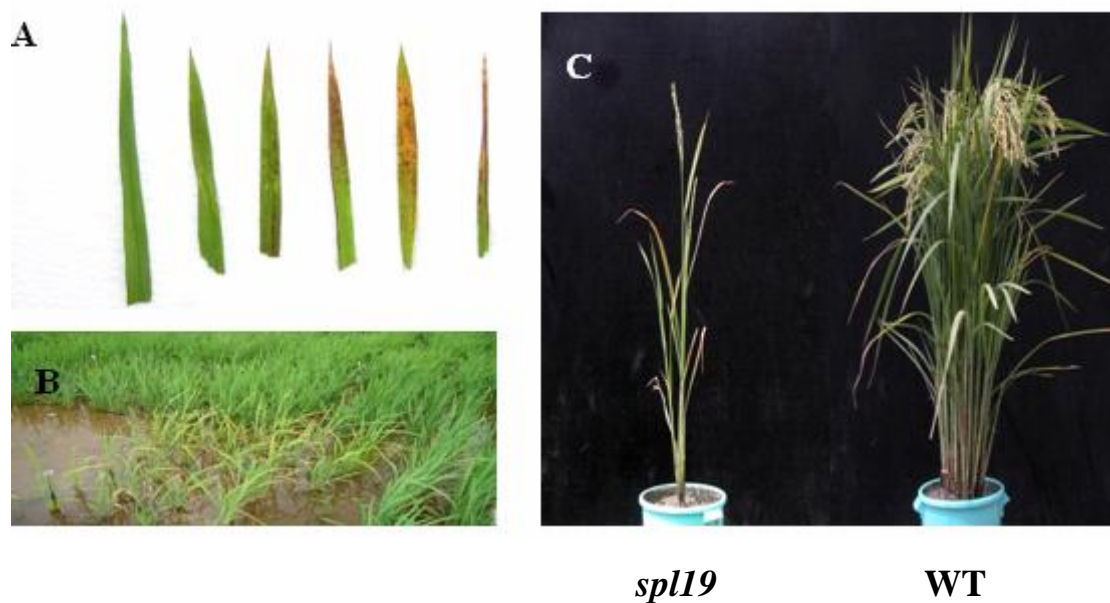


图 3-1 突变体 *spl19*及其野生型亲本日本晴在苗期和抽穗期的表型

Fig. 3-1. Phenotypes of the mutant *spl19* and the wild type at seeding and heading stage

A : 叶片随生长时间的延长斑点程度加剧 ; B 突变体 *spl19* 田间苗期的表型 ; C 突变体 *spl19* 及其野生型亲本日本晴在抽穗期的表型

A and B : Phenotypes of the mutant *spl19* at seeding stage C : Phenotypes of the mutant *spl19* and the wild type at heading stage

表 3-1 突变体 *spl19* 的表型特征Table3-1. Characterization of the mutant *spl19*

| 材料                | 株高           | 播始历期            | 有效分蘖数             | 净光合速率                                 |
|-------------------|--------------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| Material          | Plant height | Days to heading | Effective tillers | Net photosynthetic rate               |
|                   | /cm          | /d              | number per plant  | / mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |
| 突变体 <i>spl19</i>  | 72±1.7       | 64±0            | 3.7±0.2           | 25.7±0.5                              |
| 日本晴<br>Nipponbare | 93.3±4.4     | 68±0            | 12±0.6            | 21.8±0.2                              |

### 2.3 突变体与 T-DNA 共分离分析

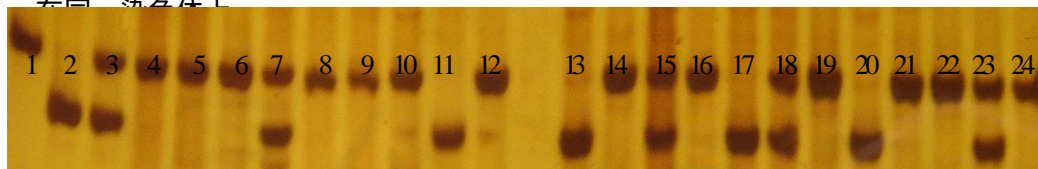
在F<sub>2</sub>代群体中取突变型植株和野生型植株各30株，分别进行选择标记基因HPT的PCR扩增及潮霉素溶液浸泡，结果显示该突变性状与T-DNA各自独立分离，不存在共分离关系，表明该突变不是由插入引起。

### 2.4 突变体与野生型光合参数测定及叶片形态观察

以突变体和非转基因对照生长20d的幼苗新鲜叶片为材料，测叶绿素含量。孕穗期用LiCor-6400型便携式光合作用测定仪测定大田生长的突变体以及对照的净光合速率。测定部位均为主茎或者大分蘖剑叶，其中突变体选还未出现锈斑的叶片。结果显示，突变体净光合速率略高于野生型对照（表3-1）。叶绿素及类胡萝卜素含量无明显变化（资料未显示）。

### 2.5 *Spl19* 基因的初定位分析

利用筛选到的发布在12条染色体上的98对多态性标记对21个F<sub>2</sub>的突变型单株进行初定位分析，结果发现目的基因与SSR标记PE12连锁度较高，21个单株中有4个单交换，4个双交换，其余13个均扩增出与日本晴对照相同的带型（图3-2），这说明突变相关基因*Spl19*与标记PE12

图 3-2 初定位结果中标记 PE12 与 *Spl19* 基因连锁Fig3-2. SSR marker PE12 is linked with the *spl19* locus in primary mapping.

1-日本晴；2-龙特普；3-F<sub>1</sub> (*spl19*×龙特普)；4-24，F<sub>2</sub> 突变型单株。

1, Nipponbare; 2, Longtepu; 3, F<sub>1</sub> (*spl19* × Longtepu); 4-24, Mutant individuals in F<sub>2</sub> population

## 2.6 *Spl19*基因的精细定位

利用已公布的日本晴和9311序列，Blast分析其差别，并近似认为这些差别在日本晴和另一籼稻品种龙特普间也存在，借助生物软件Primer Premier 5.0和DNAMAN，在PE12两边设计了36对SSR和INDEL引物，经过两亲本间多态性筛选，结果找到19对在日本晴和龙特普间有多态表现的分子标记。在初定位的基础上，利用新设计的分子标记进一步分析，用INDEL标记PSE42和PSE33筛选了315个F2突变型单株和1545个F3突变型单株。最后将*Spl19*基因定位于标记INDEL标记PSE55和PSE62之间67.5kb的序列内，其中在PSE55侧有6个交换，PSE62侧有2个交换。其他标记的交换数见图3-3。

## 2.7 *Spl19*定位区间的候选基因及突变基因的测序

在<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/index.html> 中进行Blast分析发现，*Spl19*基因定位区间共有13个预测基因，其中8个有EST序列和cDNA序列支持。预测的13个基因中，有两个基因的可能编码产物是泛素结合酶，参考其他已克隆的斑点叶相关基因（Zeng et al. 2004），我们设计了17对测序引物（FE1-17）对这两个基因进行了优先测序。测序结果显示其中一个泛素结合酶为突变相关基因，该基因有11个外显子，基因组全长6907bp，cDNA编码序列长2982bp，一段来自于第7染色体Tos17上约4.1kb(OJ1340\_C08 186486-190601)的序列反向插入第8个外显子内部。（突变基因测序工作由本实验室胡国成老师帮助完成）

## 2.8 *Spl19*基因的 RT-PCR分析

为了验证目的基因在突变体中的是否正常转录，我们对突变体和野生型中的目的基因进行了RT-PCR分析。在引物设计过程中考虑到插入突变可能不影响插入位置前基因序列的正常转录，所以根据突变可能出现的转录情况我们设计了多对引物，以期得到更多的关于基因突变后，其表达方式的变化信息（图3-4）。引物设计如下：RT1P1设在外显子1上，P2在外显子2上；RT2P1设在外显子2上，P2在外显子5上；RT3P1设在外显子8上，P2在外显子9上；RT4P1设在外显子8上，P2在插入的Tos17上，各引物在野生型和突变体的基因组及cDNA中具体扩增产物大小见（表3-2）。分析结果与预期结果基本一致：RT1、RT2在野生型和突变体的基因组及cDNA中均扩增正常；RT3在野生型的基因组和cDNA中均扩增正常，在突变体的基因组和cDNA中均无扩增产物；RT4在野生型的基因组和cDNA中均无扩增产物，在突变体的基因组可以正常扩增但在cDNA中无扩增产物；水稻内参RAC（P1：5'-CTCACCGAGGCTCCTCTCAAC-3'，P2：5'-GGATACCCGCAGCTTCCATTC-3'， $T_m=55$ ）扩增正常（图3-5）。这些结果表明：插入突变造成目的基因无法正常转录，编码产物行使其生物学功能，但是插入位点前的序列是可以转录的，而插入位点后的序列无转录产物。

### 2.9 构建 *Spl19*基因的干涉载体验证功能

以*Spl19*基因cDNA序列为模板，设计引物E70扩增目的基因5'端447bp的片段，参照pENTR Directional TOPO Cloning Kits及Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen) 试剂盒说明，以图2-9相同的流程构建RNA干涉载体pANDA340-E70。

在基因预测的过程中我们发现，与*Spl19*基因相邻的基因也被预测为一个泛素结合酶E2，并有全长cDNA支持，为了验证其是否具有与*Spl19*基因相似的生物学功能，我们同时以该基因cDNA序列为模板设计引物E69扩增5'端629bp的片段，构建RNA干涉载体pANDA340-E69。干涉载体构建好后，连接反应液转化大肠杆菌DH5，挑取单克隆，提取质粒，对质粒进行酶切和PCR鉴定。将鉴定正确的干涉载体pANDA340-E69，pANDA340-E70重组子质粒转化农杆菌菌株EHA105，菌落PCR鉴定，挑选正确的阳性重组子转化野生型亲本，现已进入重组愈伤分化阶段。

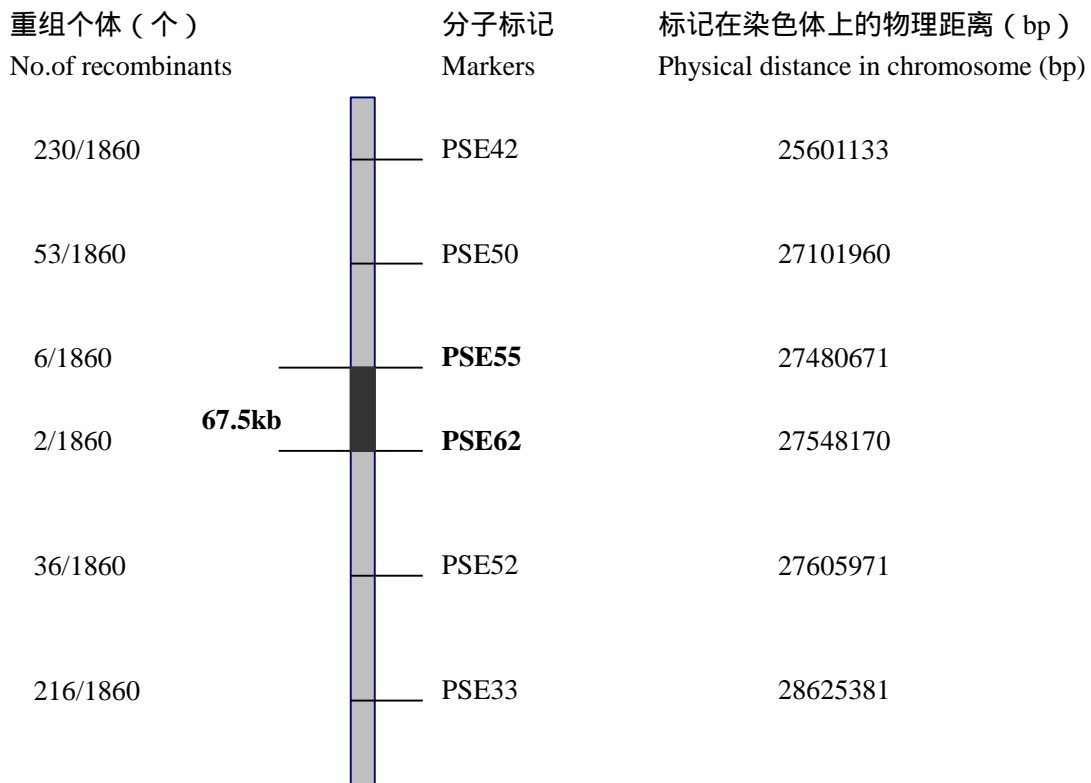


图 3-3染色体与 *spl19*基因连锁的 SSR和 INDEL分子标记在水稻染色体上的物理距离  
IRGSP 的图位序列估算分子标记间的物理距离，黑矩形区域为候选基因所在的区域

Fig 3-3 A high resolution physical map around the *spl19* locus on chromosome  
Physical distance was calculated from the map-based sequence published by IRGSP (IRGSP 2005).The black rectangle indicates the candidate region for the *Spl19* gene

### 3.讨论

共分离分析表明，突变体 *spl19* 的突变表型不是由 T-DNA 插入引起的，因此我们采用图

位克隆的策略克隆该基因。分子标记是图位克隆的基础，是在核苷酸多态性的基础之上发展起来的。为了顺利地克隆该基因，我们必须选择合适的亲本构建定位群体以便设计尽可能多的分子标记用于精细构图，但是在杂交过程中，难免会出现假杂种，F1 代假杂种的剔除与否直接影响后续试验的可靠性。利用 PCR 对 F1 代进行分子鉴定的传统方法，存在工作量大、PCR 假阳性等局限性，所以我们选用籼稻品种龙特普做杂交父本，龙特普的紫色稃尖，紫色叶鞘是一对连锁性状，对绿色稃尖，绿色叶鞘表现显性，F1 代真杂种会出现这一对显性性状，而假杂种则不表现，在苗期、抽穗期均可准确、快速的剔除假杂种，保证后续试验准确性。

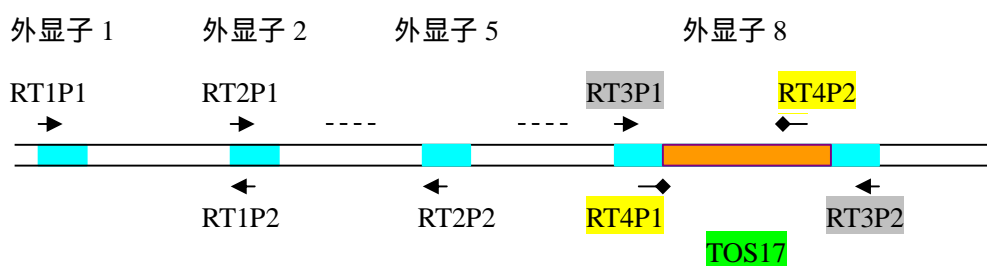


图 3-4野生型及突变体中 Spl19RT-PCR分析所用引物示意图

Fig 3-4. Schematic diagram of the different RT-PCR primers which were used to analyze Spl19 in wide type and mutant

表 3-2 RT-PCR引物在野生型及突变体中 Spl19的预计扩增结果

Table 3-2. The expected products of different RT-PCR primers which were used to analyze Spl19 in wide type and mutant

| 引物<br>Primers | 基因组 (bp)<br>Genome (bp) |               | 反转录产物 (bp)<br>cDNA (bp) |               |
|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
|               | 野生型对照<br>Wide type      | 突变体<br>Mutant | 野生型对照<br>Wide type      | 突变体<br>Mutant |
|               | RT1                     | 705           | 705                     | 298           |
| RT2           | 1311                    | 1311          | 538                     | 538           |
| RT3           | 1295                    | 无             | 942                     | 无             |
| RT4           | 无                       | 2227          | 无                       | 无             |
| RAC           | 742                     | 742           | 489                     | 489           |

虽然籼稻品种日本晴的全基因组序列已公布，但籼稻品种只有 9311 的工作框架图发表 (IRGSP 2005, Yu et al. 2002)，龙特普还没有全序列支持，所以我们只能根据日本晴和 9311 的序列差别来设计 INDEL 引物，近似的认为这些差别在日本晴和龙特普中也存在。从实验结果来看，根据网上公布的日本晴和 9311 序列新设计的分子标记大部分在亲本间具有多态性，但也有一些分子标记没有多态，其原因可能有两种其一：9311 和龙特普序列间存在差别；其二：测序结果不完全或拼装错误。因此需要更多的序列信息来提高分子标记的多态率及现有序列数据库的精确度。

泛素化介导的蛋白特异降解系统涉及泛素、泛素激活酶E1、泛素结合酶E2和泛素连接酶E3的一系列反应。泛素激活酶E1将泛素转移给泛素结合酶E2后，E2有两种作用方式：1，直

接将泛素转移到靶蛋白的Lys残基上，完成泛素标记；2，将泛素转移到与靶蛋白特异识别的泛素连接酶E3，使底物发生单泛素化修饰或多聚泛素化修饰。E1和E3通过相同的基序与E2连接，这说明在反应循环过程中，E2必须在E1和E3之间穿梭往返运行，保证降解信号的顺利传递。泛素连接酶E3被认为是底物特异性选择降解的关键作用酶，关于它的研究已经有很多。作为降解信号中间传递者的泛素结合酶E2，虽然没有泛素连接酶E3纷繁复杂的种类和结构，但在泛素化系统中同样具有非常重要的作用。Zeng等年在水稻中克隆了位于第12染色体上的斑点叶突变相关基因*Spl11*（与本研究所克隆的突变基因在不同的染色体上），发现该基因编码一个具有U-box结构的泛素连接酶E3，而本研究克隆的编码泛素结合酶E2基因恰好是泛素化系统中泛素连接酶E3的上游作用蛋白。两个研究中涉及的突变性状也基本一致，因此我们推测两个突变基因最终引起性状变化的机理可能是一致的（Zeng et al. 2002, 2004）。

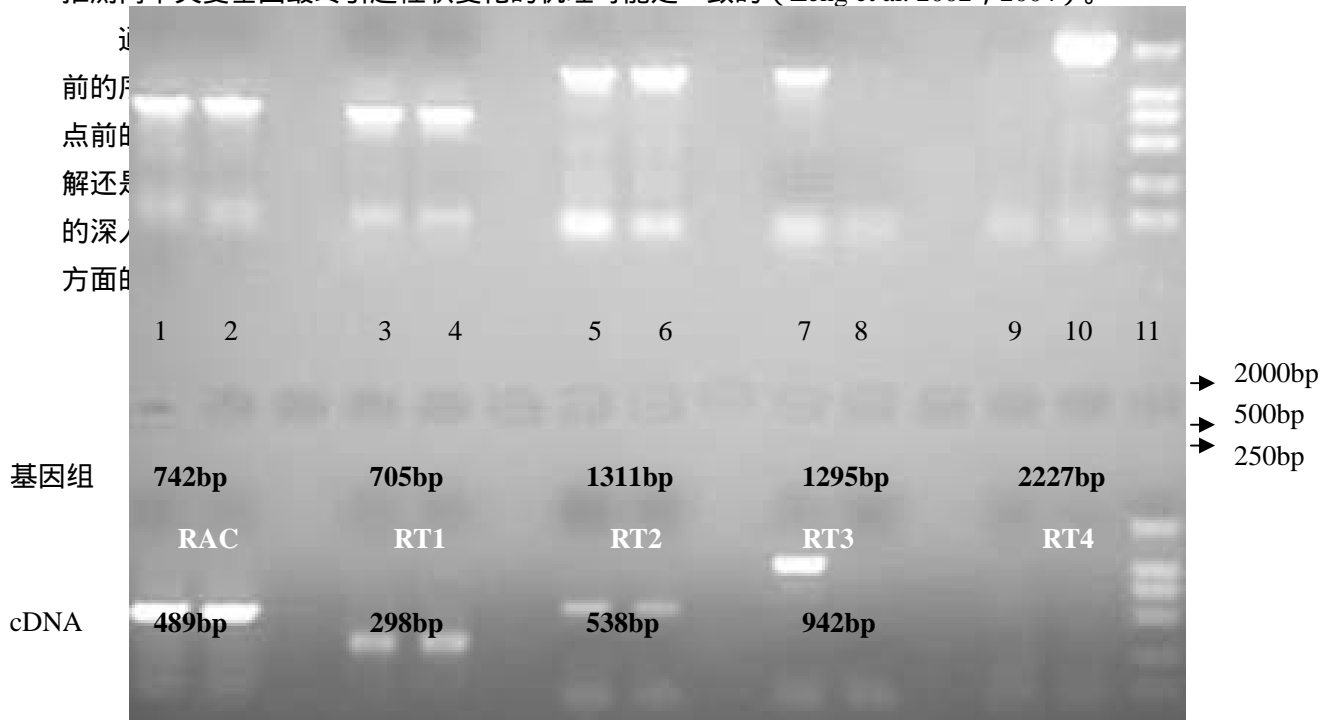


图 3-5野生型、突变体的基因组和 cDNA中不同引物 *Spl19*基因的 PCR RT-PCR分析结果

Fig3-5 PCR analysis of *Spl19* in genome of wide type and mutant. RT-PCR analysis of *Spl19* in wide type and mutant

基因组：*Spl19* 基因在野生型对照和突变体基因组中的 PCR 扩增。1, 3, 5, 7, 9：野生型对照；2, 4, 6, 8, 10：突变体；11：DL2000 ( TaKaRa )；RAC：水稻内参；RT1, 2, 3, 4：不同的 RT-PCR 引物

cDNA：*Spl19* 基因在野生型对照和突变体 cDNA 中的 PCR 扩增。1, 3, 5, 7, 9：野生型对照；2, 4, 6, 8, 10：突变体；11：DL2000 ( TaKaRa )；RAC：水稻内参；RT1, 2, 3, 4：不同的 RT-PCR 引物

Genome: PCR analysis of *Spl19* in genome of wide type and mutant. 1, 3, 5, 7, 9: Wide type; 2, 4, 6, 8, 10: Mutant ; 11: DL2000 ( TaKaRa ) ; RAC : Rice actin gene ; RT1 , 2 , 3 , 4 : Different primers of RT-PCR

cDNA: RT-PCR analysis of *Spl19* in cDNA of wide type and mutant. 1, 3, 5, 7, 9: Wide type; 2, 4, 6, 8, 10: Mutant ; 11: DL2000 ( TaKaRa ) ; RAC : Rice actin gene ; RT1 , 2 , 3 , 4 : Different primers of RT-PCR

## 第四章 全文结论

我们在本实验室构建的T-DNA插入水稻突变体库中,发现了三个以日本晴为遗传背景的突变体:温度钝感型淡绿叶突变体 $pgl2$ (pale green leaf 2);温度敏感型黄绿叶突变体 $ypgl1(t)$ (yellow pale green leaf 1, temporally);斑点叶突变体 $spl19$ (spotted leaf 19)。并对这三个突变体进行了形态学鉴定、遗传分析和初步的生理学研究,克隆了 $Ypgl1(t)$ 和 $Spl19$ 基因并进行了部分功能研究。主要结果如下:

1. 潮霉素浸泡及PCR扩增结果显示,温度钝感型淡绿叶突变体 $pgl2$ 不是由T-DNA插入引起。该突变在整个生育期均表现为淡绿色,同时伴有半矮化、分蘖少、生育期延迟的表型。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交,构建F<sub>2</sub>群体对突变基因进行精细定位。初定位结果显示目的基因与第8染色体SSR标记RM331连锁度较高,在该标记附近发展了14对INDEL标记,将突变基因进一步定位于着丝粒上2.37 Mb的区间,并对该区间候选基因进行了分析。突变体叶绿素的总量与对照相仿,但是叶绿素a/b比值趋于1,明显低于对照。推测突变基因可能与叶绿素a、b间的转化有关。

本研究首次确定了目的基因在染色体上的位置并对其相关功能进行初步研究,为着丝粒区间功能基因的克隆方法做了探索性的尝试。研究结果不仅验证了着丝粒区间有功能基因的假说,而且还可能为常染色质序列、异染色质序列以及核外叶绿体基因组序列相互间的进化关系提供有益的线索。本文还就着丝粒中基因定位的引物设计方法进行了讨论。

2. 共分离分析表明温度敏感型黄绿叶突变体 $ypgl1(t)$ 不是由T-DNA插入引起。遗传学分析结果显示该突变性状是由一对单隐性核基因控制。突变体表现为:苗期,日积温偏低叶片亮黄色;营养生长期,随着温度的升高,叶片颜色逐渐转变为淡绿色,同时伴有半矮化性状,但分蘖数与对照差异不大;生殖生长期,突变体抽穗明显晚于对照,从播种到抽穗生长时间可达92天。由于9月以后温度开始回落,在突然降温的条件下,突变体会出现老叶淡绿色,其他分蘖的新生叶片黄色的情况。在海南陵水连续三年播种突变体,苗期仍表现黄叶性状,而且颜色更为鲜艳,偏向于橙色,但插秧后迅速死亡,无法完成全生育期。突变体与野生型电镜观察显示前者叶绿体发育异常,嗜锍滴大量集聚,淀粉粒消失。温控试验结果表明,该突变体在30℃的温度条件生长时,表现为明显的黄叶表型,但当温度33℃时则转变为淡绿色。突变体叶绿素a、b的含量均大幅减少,24℃时,叶绿素b减幅大于叶绿素a,造成叶绿素a/b比值达到19.2,随着温度上升叶绿素b快速增加,33℃以后叶绿素a/b比值基本趋于正常(3左右),野生型叶绿素a、b的含量和a/b比值变化不大,突变体类胡萝卜素含量明显高于对照,推测可能是起光保护的作用。

利用突变体和籼稻品种龙特普杂交,构建F<sub>2</sub>群体对突变基因进行精细定位。初定位结果显示目的基因与第7染色体SSR标记RM11(67 cM)连锁度较高,在RM11两端附近进一步发展了22对INDEL标记,将突变基因进一步定位于INDEL标记YT6132和YT614之间10.3kb的序列内,该区间有两个预测基因均编码未知蛋白,测序结果显示 $Ypgl1(t)$ (KOME Accession No. AK062845)基因第二个外显子上发生54个碱基的缺失突变,对应缺失18个氨基酸,读码框没



有发生变化。经检索,我们发现该基因编码产物被定位于细胞质中,与叶绿体发育相关,一次跨膜。生物信息学根据基因结构预测功能发现,该基因编码一个介导蛋白互作的锚蛋白,而缺失的18个氨基酸正处于预测锚蛋白结构域C末端。RT-PCR证明突变体中 $Ypgll(t)$ 仍可正常表达。构建了干涉载体并转化野生型对照,现已处于愈伤分化阶段。

本研究首次阐明了目的基因染色体位置与生物学功能的对应关系,分析了基因突变后相关性状在不同温度下的变化情况,为进一步揭示该基因的生物学功能的详细信息,了解其参与的生理学途径及其在介导蛋白互作中的作用方式,奠定了理论基础并提供了有益的研究线索。研究结果不仅对目的基因突变后的转录方式进行了研究,而且在电镜水平观察了不同温度条件下目的基因突变后对叶绿体发育的影响。在叶绿素、类胡萝卜的含量测定基础上,参考基因功能预测,首次发现锚蛋白可能在现已基本明确的叶绿素合成过程中发挥重要的生物学作用,为进一步揭示光合作用的详细机理,开辟了新的研究途径。

3. 斑点叶突变体 $spl19$ 从三叶期开始出现小的铁锈斑点,随着新叶片的生长,老叶片斑点逐步扩大直至叶尖部分黄化枯死,衰老表现明显早于对照。遗传学分析表明该突变性状是由一对单隐性核基因控制。潮霉素浸泡及PCR扩增结果显示,该突变并非由T-DNA插入引起。利用突变体和籼稻品种龙特普杂交,构建F<sub>2</sub>群体对突变基因进行定位。经过初定位、精细定位,最后将突变基因定位于INDEL标记PSE55和PSE62之间67.5kb的序列内,该区间有13个预测基因,其中有两个编码泛素结合酶。测序结果显示 $Spl19$ 基因的8个外显子内部反向插入一段来自于第7染色体Tos17上约4.1kb的序列,RT-PCR结果表明突变体中插入位点前的目的基因序列仍然发生转录,插入位点后的序列无转录产物。根据基因结构预测功能发现,该基因可能编码一个介导蛋白特异性降解的泛素结合酶。

本研究首次揭示了目的基因的相关性状,分析了基因突变后插入位点前后的转录方式。虽然 $Spl19$ 基因和现已发表的 $Spl11$ 基因不在同一染色体上,但它们引起的相关突变性状有很大的相似性。 $Spl11$ 基因编码一个具有U-box结构的泛素连接酶E3,而本研究克隆的编码泛素结合酶E2基因是泛素化系统中泛素连接酶E3的上游作用蛋白,因此我们推测两个突变基因最终引起性状变化的机理可能是一致的,这为揭示真核生物体内最重要蛋白质特异降解系统的作用机理奠定了理论基础,并将该系统中的两个重要组成元件的作用首次在表型水平上联系起来。

## 参考文献

- [1]. 陈受宜, 朱立煌, 洪建. 水稻耐盐突变体的RFLP分析. 植物学报, 1991, 33(8): 569~573.
- [2]. 程式华, 李建. 现代中国水稻. 金盾出版社, 2007.
- [3]. 崔海瑞, 夏英武, 高明尉. 温度对水稻突变体W1叶色及叶绿素生物合成的影响. 核农学报, 2001, 15(5): 269~273.
- [4]. 郭龙彪, 储成才, 钱前. 水稻突变体与功能基因组学. 植物学通报, 2006, 23: 1~13.
- [5]. 韩斌. 植物功能基因组研究. 中国科学院院刊, 2005, 4: 250~255.
- [6]. 凌定厚, 梁承邨, 马镇荣, 陈梅芳, 何炳森. 籼稻体细胞无性系雄性不育变异及其表现. 中国水稻科学, 1990, 4(1): 15~21.
- [7]. 卢阳江, 郑康乐. 一种简易提取水稻DNA的方法. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47~48.
- [8]. 栾维江, 孙宗修. Ac/Ds标签系统与水稻功能基因组学. 植物生理和分子生物学报, 2005, 31(5): 441~450.
- [9]. 潘瑞炽, 王小菁, 李娘辉. 植物生理学(第五版). 高等教育出版社, 2004, 58~66.
- [10]. 钱前, 程式华. 水稻遗传学和功能基因组学. 科学出版社, 2006.
- [11]. 萨母布鲁克J, 弗里奇EF, 曼尼阿蒂斯T. 分子克隆实验指南(第三版). 科学出版社, 2002: 385~455.
- [12]. 邵继荣, 朱雪梅, 谢戎, 任正隆, 孙敬三. 水稻温敏失绿突变体的Rubisco活化酶活性、蛋白质与氨基酸组分的变化. 实验生物学报, 2004, 37(3): 183~188.
- [13]. 舒庆尧, 刘贵付, 夏英武. 温敏水稻叶色突变体的研究. 核农学报, 1996, 10(1): 6~10.
- [14]. 孙丙耀, 顾福根, 袁云香, 谈建中, 万志刚, 陆小平. 水稻Ds插入双分蘖突变体形成机理的分析. 作物学报, 2007: 33(1): 97~101.
- [15]. 孙立华, 王月芳, 蒋宁, 李和标. 具广亲和性的水稻隐性高秆细胞突变体. 遗传学报, 1994, 21(1): 67~73.
- [16]. 汪得凯, 张红心, 胡国成, 付亚萍, 斯华敏, 孙宗修. 一个水稻大叶角度突变体lla的遗传分析及基因克隆. 科学通报, 2005: 50(4): 399~401.
- [17]. 裔传灯, 顾铭洪. 植物着丝粒的研究进展. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2001, 28(1): 39~44.
- [18]. 赵成章, 郑康乐, 戚秀芳, 孙宗修, 傅亚萍. 水稻再生植株及后代的性状表现. 遗传学报, 1982, 9(4): 320~324.
- [19]. 朱秀英, 陈璋, 卢勤. 水稻体细胞无性系的建立及其遗传变异的研究. 遗传, 1990, 12(6): 1~4.
- [20]. 朱旭东, 陈红旗, 罗达, 张建军, 方红民, 闵绍楷. 水稻中花11辐射突变体的分离与鉴定. 中国水稻科学, 2003, 17: 205~210.
- [21]. 朱正歌, 肖晗, 傅亚萍, 胡国成, 于永红, 斯华敏, 张景六, 孙宗修. 水稻转座子突变体库的构建及突变类型的遗传分析. 生物工程学报, 2001, 17: 288~292.

- [22]. Agrawal GK, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Miyao A, Hirochika H. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel ostatic gene. *Plant Physiol.* 2001, 125(3): 1248~1257.
- [23]. Albert S, Despres B, Guilleminot J, Bechtold N, Pelletier G, Delseny M, Devic M. The *EMB 506* gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos. *Plant J.* 1999, 17(2): 169~179.
- [24]. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci.* 1977, 74(12): 5350~5354.
- [25]. An G, Lee S, Kim S, Kim S. Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant Cell Physiol.* 2005, 46: 14~22.
- [26]. Ananiev EV, Phillips RL, Rines HW. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proc Natl Acad Sci* 1998, 95: 13073~13078.
- [27]. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998, 19(11): 1853~1861.
- [28]. Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1949, 24: 1~15.
- [29]. Barakat A, Gallois P, Raynal M, Mestre-Ortega D, Sallaud C, Guiderdoni E, Delseny M, Bernardi G. The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic *Arabidopsis* and rice. *FEBS Lett.* 2000, 471: 161~164.
- [30]. Benedetti CE, Arruda P. Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic *Arabidopsis* caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol.* 2002, 12(8): 1255~1263.
- [31]. Bouche N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm H. A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem.* 2002, 277(24): 21851~21861.
- [32]. Breeden L, Nasmyth K. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the *Notch* gene of *Drosophila*. *Nature* 1987, 329(6140): 651~654.
- [33]. Brivio M, Verboom W, Reinhoudt DN. Miniaturized continuous flow reaction vessels: influence on chemical reactions. *Lab Chip* 2006, 6(3): 329~344.
- [34]. Cheng C, Daigen M, Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17. *Mol Genet Genomics* 2006, 276(4): 378~390.
- [35]. Cheng Z, Dong F, Langdon T, Ouyang S, Buell CR, Gu M, Blattner FR, Jiang J. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell* 2002, 14: 1691~1704.
- [36]. Chin HG, Choe MS, Lee S H, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC. Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J.* 1999, 19(5): 615~623.
- [37]. Chinchilla D, Merchan F, Megias M, Kondorosi A, Sousa C, Crespi M. Ankyrin protein kinases: a

- novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Mol Biol.* 2003, 51(4): 555~566.
- [38]. Choi MS, Kim MC, Yoo JH, Moon BC, Koo SC, Park BO, Lee JH, Koo YD, Han HJ, Lee SY, Chung WS, Lim CO, Cho MJ. Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.). *J Biol Chem.* 2005, 280(49): 40820~40831.
- [39]. Choo KH, Vissel B, Nagy A, Earle E, Kalitsis P. A survey of the genomic distribution of alpha-satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19: 1179~1182.
- [40]. Chuong PV Omura T. Studies on the chlorosis expressed under low temperature conditions in rice, *Oryza sativa* L. *Bull Inst Trop Agr Kyushu Univ.* 1982, 5: 1~58.
- [41]. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994, 79(1): 13~21.
- [42]. Clague MJ, Urbe S. Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol.* 2006, 16(11): 551~559.
- [43]. Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* 2001, 126(2): 480~484.
- [44]. Copenhaver GP, Nickel K, Kuromori T, Benito MI, Kaul S, Lin X, Bevan M, Murphy G, Harris B, Parnell LD, Martienssen RA, Marra M, Preuss D. Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres. *Science* 1999, 286: 2468~2474.
- [45]. Coulson A, Sulston J, Brenner S, Karn J. Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci.* 1986, 83(20): 7821~7825.
- [46]. Dong F, Miller J T, Jackson S A, Wang G L, Ronald P C, Jiang J. Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1998, 95(14): 8135~8140.
- [47]. Dong X, Li X, Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Clarke J. Regulation of systemic acquired resistance by NPR1 and its partners. *Novartis Found Symp.* 2001, 236:165~173; discussion 173~175.
- [48]. Dong X. The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein ACD6 in programmed cell death and plant defense. *Sci STKE.* 2004, (221):pe6.
- [49]. Dye BT, Schulman BA. Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007, 36: 131~150.
- [50]. Eckhardt U, Grimm B, Hörtensteiner S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol Biol.* 2004, 56: 1~14.
- [51]. Feng Q, Zhang Y, Hao P, Wang S, Fu G, Huang Y, Li Y, Zhu J, Liu Y, Hu X, Jia P, Zhang Y, Zhao Q, Ying K, Yu S, Tang Y, Weng Q, Zhang L, Lu Y, Mu J, Lu Y, Zhang LS, Yu Z, Fan D, Liu X, Lu T, Li C, Wu Y, Sun T, Lei H, Li T, Hu H, Guan J, Wu M, Zhang R, Zhou B, Chen Z, Chen L, Jin Z, Wang R, Yin H, Cai Z, Ren S, Lv G, Gu W, Zhu G, Tu Y, Jia J, Zhang Y, Chen J, Kang H, Chen X, Shao C, Sun Y, Hu Q, Zhang X, Zhang W, Wang L, Ding C, Sheng H, Gu J, Chen S, Ni L, Zhu F, Chen W, Lan L, Lai Y, Cheng Z, Gu M, Jiang J, Li J, Hong G, Xue Y, Han B. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature* 2002, 420: 316~320.
- [52]. Foord R, Taylor IA, Sedgwick SG, Smerdon SJ. X-ray structural analysis of the yeast cell cycle

- regulator Swi6 reveals variations of the ankyrin fold and has implications for Swi6 function. *Nat Struct Biol.* 1999, 6(2): 157~165.
- [53]. Frick G, Su Q, Apel K, Armstrong GA. An *Arabidopsis porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. *Plant J.* 2003, 35: 141~153.
- [54]. Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 2002, 99(17): 11519~11524.
- [55]. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002, 82(2): 373~428.
- [56]. Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 2002, 296: 92~100.
- [57]. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1975, 72(1): 11~15.
- [58]. Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 1996, 274(5289): 1001~1005.
- [59]. Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 2001, 414(6861): 271~276.
- [60]. Greco R, Ouwerkerk PB, Taal AJ, Favalli C, Beguiristain T, Puigdomenech P, Colombo L, Hoge JH, Pereira A. Early and multiple Ac transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. *Plant Mol Biol.* 2001, 46(6): 215~227.
- [61]. Grossman AR, Lohr M, and Im CS. *Chamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu Rev Genet.* 2004, 38: 119~173.
- [62]. Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC. *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2004, 45(10): 1361~1370.
- [63]. Hamilton KS, Ellison MJ, Barber KR, Williams RS, Huzil JT, McKenna S, Ptak C, Glover M, Shaw GS. Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. *Structure* 2001, (10): 897~904.
- [64]. Han B, Xue Y, Li J, Deng XW, Zhang Q. Rice functional genomics research in China. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007, [Epub ahead of print].

- [65]. Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 2001, 19(10): 946~951.
- [66]. Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin SY, Antonio BA, Parco A, Kajiya H, Huang N, Yamamoto K, Nagamura Y, Kurata N, Khush GS, Sasaki T. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics* 1998, 148: 479~494.
- [67]. Hatakeyama S, Matsumoto M, Yada M, Nakayama KI. Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones. *Genes Cells* 2004, 9(6): 533~548.
- [68]. Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem.* 2001, 276(35): 33111~33120.
- [69]. Hellmann H, Estelle M. Plant development: regulation by protein degradation. *Science* 2002, 297(5582): 793~797.
- [70]. Henikoff S, Ahmad K, Malik H S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 2001, 293(5532): 1098~1102.
- [71]. Henikoff S, Till BJ, Comai L. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.* 2004, 135(2): 630~636.
- [72]. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998, 67: 425~479.
- [73]. Heslop-Harrison JS, Murata M, Ogura Y, Schwarzacher T, Motoyoshi F. Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes. *Plant Cell* 1999, 11: 31~42.
- [74]. Hettema EH, Valdez-Taubas J, Pelham HR. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J.* 2004, 23(6): 1279~1288.
- [75]. Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001, 2(3): 195~201.
- [76]. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 1994, 6: 271~282.
- [77]. Hirochika H. Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. *Cur Opin Plant Biol.* 2001, 4(2): 118~122.
- [78]. Hirochika H, Guiderdoni E, An G, Hsing Y, Eun M, Han C, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V, Leung H. Rice mutant resources for gene discovery. *Plant Mol Biol.* 2004, 54: 325~334.
- [79]. Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H and Kanda M. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci.* 1996, 93(15): 7783~7788.
- [80]. Honda R, Yasuda H. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 2000, 19(11): 1473~1476.
- [81]. Hosouchi T, Kumekawa N, Tsuruoka H, Kotani H. Physical map-based sizes of the centromeric regions of *Arabidopsis thaliana* chromosomes 1, 2, and 3. *DNA Res.* 2002, 9: 117~121.

- [82]. Hu X, Wu QF, Xie YH, Ru H, Xie F, Wang XY, Wang CY. Ectopic Expression of the *Pttkn1* Gene Induces Alterations in the Morphology of the Leaves and Flowers in *Petunia. hybrida* Vilm. 2005, 47: 1153~1158.
- [83]. Huang J, Chen F, Del Casino C, Autino A, Shen M, Yuan S, Peng J, Shi H, Wang C, Cresti M, Li Y. An ankyrin repeat-containing protein, characterized as a ubiquitin ligase, is closely associated with membrane-enclosed organelles and required for pollen germination and pollen tube growth in lily. *Plant Physiol.* 2006, 140(4): 1374~1383.
- [84]. Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quai PH. PHYTOCHROME- INTERACTING FACTOR 1 is a critical *bHLH* regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 2004, 305: 1937~1941.
- [85]. Hur J, Jung KH, Lee CH, An G. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci.* 2004, 167: 417~426.
- [86]. Ichitani K, Namigoshi K, Sato M, Taura S, Aoki M, Matsumoto Y, Saitou T, Marubashi W, Kuboyama T. Fine mapping and allelic dosage effect of *Hwc1*, a complementary hybrid weakness gene in rice. *Theor Appl Genet.* 2007, Mar 21 [Epub ahead of print].
- [87]. Imai N, Matsuda N, Tanaka K, Nakano A, Matsumoto S, Kang W. Ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins. *J Virol.* 2003, 77(2): 923~930.
- [88]. International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP). The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 2005, 436: 793~800.
- [89]. Ito Y, Eiguchi M, Kurata N. Establishment of an enhancer trap system with Ds and GUS for functional genomics in rice. *Mol Genet Genom.* 2004, 271: 639~650.
- [90]. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 1998, 95(6): 749~758.
- [91]. Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL. *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol.* 2002, 129: 440~450.
- [92]. Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 2006, 311(5758): 222~226.
- [93]. Jeon J, Lee S, Jung K, Jun S, Jeong D, Lee J, Kim C, Jang S, Lee S, Yang K, Nam J, An K, Han M, Sung R, Choi H, Yu J, Choi J, Cho S, Cha S, Kim S, An G. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* 2000, 22: 561~570.
- [94]. Jeong D, An S, Kang H, Moon S, Han J, Park S, Lee H, An K, An G. T-DNA Insertional Mutagenesis for Activation Tagging in Rice. *Plant Physiol.* 2002, 130: 1636~1644.
- [95]. Jiang H, Wang S, Dang L, Wang S, Chen H, Wu Y, Jiang X, Wu P. A novel short-root gene encodes a glucosamine-6-phosphate acetyltransferase required for maintaining normal root cell shape in rice. *Plant Physiol.* 2005, 138: 232~242.
- [96]. Jiang N, Bao Z, Zhang X, Hirochika H, Eddy SR, McCouch SR, Wessler SR. An active DNA transposon family in rice. *Nature* 2003, 421(6919): 163~167.
- [97]. Jin J, Zhu C, Zhang H X, Sun Z X. Preliminary study on a gravity-insensitive rice mutant. *Journal*

- of Zhejiang University 2004, 5(2): 144~148.
- [98]. Jin WZ, Wang SM, Xu M, Duan RJ, Wu P. Characterization of enhancer trap and gene trap harboring Ac/Ds transposon in transgenic rice. *J Zhejiang Univ Sci.* 2004, 5(4): 390~399.
- [99]. Jin W, Melo JR, Nagaki K, Talbert PB, Henikoff S, Dawe RK, Jiang J. Maize centromeres: Organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell* 2004, 16: 571~581.
- [100]. Jung KH, Han MJ, Lee YS, Kim YW, Hwang I, Kim MJ, Kim YK, Nahm BH, An G. Rice Undeveloped tapetum1 is a major regulator of early tapetum development. *Plant Cell* 2005, 17(10): 2705~2722.
- [101]. Jung KH, Hur J, Ryu CH, Choi Y, Chung YY, Miyao A, Hirochika H, An G. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol.* 2003, 44(5): 463~472.
- [102]. Kaszas E, Birchler JA. Misdivision analysis of centromere structure in maize. *EMBO J.* 1996, 15: 5246~5255.
- [103]. Kepinski S, Leyser O. Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. *Plant Cell* 2002, 14:81~95.
- [104]. Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, Hirano HY. The plant MITE mPing is mobilized in anther culture. *Nature* 2003, 421(6919): 167~170.
- [105]. Kim CM, Piao HL, Park SJ, Chon NS, Je BI, Sun B, Park SH, Park JY, Lee EJ, Kim MJ, Chung WS, Lee KH, Lee YS, Lee JJ, Won YJ, Yi G, Nam MH, Cha Y S, Yun DW, Eun MY, Han CD. Rapid, large-scale generation of Ds transposant lines and analysis of the Ds insertion sites in rice. *Plant J.* 2004, 39(2): 252~263.
- [106]. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999, 96(5): 635~644.
- [107]. Kohli A, Xiong J, Greco R, Christou P, Pereira A. Tagged transcriptome display (TTD) in *indica* rice using Ac transposition. *Mol Genet Genomics* 2001, 266(1): 1~11.
- [108]. Kolesnik T, Szeverenyi I, Bachmann D, Kumar CS, Jiang S, Ramamoorthy R, Cai M, Ma Z G, Sundaresan V, Ramachandran S. Establishing an efficient Ac/Ds tagging system in rice: large-scale analysis of Ds flanking sequences. *Plant J.* 2004, 37(2): 301~314.
- [109]. Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Korber H, Redei GP, Schell J. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci.* 1989, 86(21): 8467~8471.
- [110]. Kumagai H, Hakoyama T, Umehara Y, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Kouchi H. A novel ankyrin-repeat membrane protein, IGN1, is required for persistence of nitrogen-fixing symbiosis in root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2007, 143(3): 1293~1305.
- [111]. Kumekawa N, Hosouchi T, Tsuruoka H, Kotani H. The size and sequence organization of the centromeric region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. *DNA Res.* 2000, 7: 315~321.
- [112]. Kumekawa N, Hosouchi T, Tsuruoka H, Kotani H. The size and sequence organization of the



- centromeric region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. DNA Res. 2001, 8: 285~290.
- [113]. Kurata N, Miyoshi K, Nonomura K, Yamazaki Y, Ito Y. Rice mutants and genes related to organ development, morphogenesis and physiological traits. Plant Cell Physiol. 2005, 46(1): 48~62.
- [114]. Kusaba M. RNA interference in crop plants. Curr Opin Biotechnol. 2004, 15(2): 139~143.
- [115]. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. Trends Cell Biol. 1998, 8(10): 397~403.
- [116]. Lee H R, Zhang W, Langdon T, Jin W, Yan H, Cheng Z, Jiang J. Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolution-ary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. Proc Natl Acad Sci. 2005, 102(33): 11793~11798.
- [117]. Lee S, Jung KH, An G, Chung YY. Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, *OsCPI*, using T-DNA gene-trap system. Plant Mol Biol. 2004b, 54(5): 755~765.
- [118]. Lee S, Kim J, Han JJ, Han MJ An G. Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative suppressor of overexpression of *CO1/AGAMOUS-LIKE 20(SOC1/AGL20)* ortholog in rice. Plant J. 2004a, 38: 754~764.
- [119]. Lee S, Kim JH, Yoo ES, Lee C-H, Hirochika H, An G. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. Plant Mol Biol. 2005, 57: 805~818.
- [120]. Leung H. Public research platform for participatory gene discovery in the developing world. Abstracts of International Rice Congress. 2002, Sept, Beijing, China 16~20.
- [121]. Leyser O. Auxin signalling: the beginning, the middle and the end. Curr Opin Plant Biol. 2001, 4(5): 382~386.
- [122]. Li HY, Chye ML. *Arabidopsis* Acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with an ethylene-responsive element-binding protein, AtEBP, via its ankyrin repeats. Plant Mol Biol. 2004, 54(2): 233~243.
- [123]. Li L, Wang X, Sasidharan R, Stolc V, Deng W, He H, Korbel J, Chen X, Tongprasit W, Ronald P, Chen R, Gerstein M, Wang Deng X. Global identification and characterization of transcriptionally active regions in the rice genome. PLoS ONE. 2007, 14; 2: e294.
- [124]. Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuan M, Luo D, Han B, Li J. Control of tillering in rice. Nature 2003a, 422: 618~621.
- [125]. Li Y, Qian Q, Zhou Y, Yan M, Sun L, Zhang M, Fu Z, Wang Y, Han B, Pang X, Chen M, Li J. *BRITTLE CULM1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. Plant Cell 2003b, 15: 2020~2031.
- [126]. Lin X, Long L, Shan X, Zhang S, Shen S, Liu B. In planta mobilization of mPing and its putative autonomous element Pong in rice by hydrostatic pressurization. J Exp Bot. 2006, 57(10): 2313~2323.
- [127]. Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 1995, 8(3): 457~463.
- [128]. Liu YG, Whittier RF. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and

- sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 1995, 25(3): 674~681.
- [129]. Lu H, Rate DN, Song JT, Greenberg JT. ACD6, a novel ankyrin protein, is a regulator and an effector of salicylic acid signaling in the *Arabidopsis* defense response. *Plant Cell* 2003, 15(10): 2408~2420.
- [130]. Lu Z, Xu S, Joazeiro C, Cobb MH, Hunter T. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* 2002, 9(5): 945~956.
- [131]. Lueking A, Cahill DJ, Mullner S. Protein biochips: A new and versatile platform technology for molecular medicine. *Drug Discov Today*. 2005, 10(11): 789~794.
- [132]. Ma JX, Bennetzen JL. Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a centromeric region of rice. *Proc Natl Acad Sci*. 2006, 103(2): 383~388.
- [133]. Ma JX, Scott A. Jackson. Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome Res*. 2006, 16: 251~259.
- [134]. Maekawa M, Rikiishi K, Matsuura T, Noda K. A marker line H-126, carries a genetic factor making chlorophyll mutation variegated. *Rice Genet. Newslett*. 1999, 16: 61~62.
- [135]. Maluszynski M, Nichterlein K, van Zanten L, Ahloowalia B. Official released mutant varieties the FAO/IAEA database. *Mutation Breed* 2000, 12: 1~88.
- [136]. Margis-Pinheiro M, Zhou XR, Zhu QH, Dennis ES, Upadhyaya NM. Isolation and characterization of a Ds-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant Cell Rep*. 2005, 23(12): 819~833.
- [137]. Markus Kuhlmann, Katja Horvay, Anne Strathmann, Thorsten Heinekamp, Ute Fischer, Stefan Böttner, Wolfgang Dröge-Laser. The  $\alpha$ -Helical D1 Domain of the Tobacco bZIP Transcription Factor BZI-1 Interacts with the Ankyrin-repeat Protein ANK1 and Is Important for BZI-1 Function, Both in Auxin Signaling and Pathogen Response. *J. Biol. Chem*. 2003, 278: 8786~8794.
- [138]. McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol*. 2000b, 18(4): 455~457.
- [139]. McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol*. 2000a, 123 (2): 439~442.
- [140]. McCouch SR, Teytelman L, Xu YB, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*. 2002, 9: 199~207.
- [141]. Meinke DW, Meinke LK, Showalter TC, Schissel AM, Mueller LA, Tzafirir I. A sequence-based map of *Arabidopsis* genes with mutant phenotypes. *Plant Physiol*. 2003, 131: 409~418.
- [142]. Michael H. Glickman, Aaron Ciechanover. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev*. 2002, 82: 373~428.
- [143]. Miyao A, Iwasaki Y, Kitano H, Itoh J, Maekawa M, Murata K, Yatou O, Nagato Y, Hirochika H. A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate

- functional analysis of rice genes. *Plant Mol Biol*. 2007, 63(5): 625~635.
- [144]. Molitoris BA. Putting the actin cytoskeleton into perspective: pathophysiology of ischemic alterations. *Am J Physiol*. 1997, 272:430~433.
- [145]. Mori M, Tomita C, Sugimoto K, Hasegawa M, Hayashi N, Dubouzet JG, Ochiai H, Sekimoto H, Hirochika H, Kikuchi S. Isolation and molecular characterization of a *Spotted leaf 18* mutant by modified activation-tagging in rice. *Plant Mol Biol*. 2007, 63(6): 847-860.
- [146]. Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, Talbert PB, Kim M, Jones KM, Henikoff S, Buell CR, Jiang J. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat. Genet*. 2004, 36: 138~145.
- [147]. Nagata N , Tanaka R , Satoh S , Tanaka A. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of prochlorococcus species. *Plant Cell* 2005, 17: 233~240.
- [148]. Nakanishi H , Nozue H , Suzuki K , Kaneko Y, Taguchi G, Hayashida N. Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant *pcb2* which accumulates divinyl chlorophylls. *Plant Cell Physiol*. 2005, 46(3): 467~473.
- [149]. Nakazaki T, Okumoto Y, Horibata A, Yamahira S, Teraishi M, Nishida H, Inoue H, Tanisaka T. Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* 2003, 421(6919): 170~172.
- [150]. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990, 2(4): 279~289.
- [151]. Nodzon LA, Xu WH, Wang Y, Pi LY, Chakrabarty PK, Song WY. The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2004, 40(6): 996~1006.
- [152]. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 1988, 120(3): 621~623.
- [153]. Oikawa T, Koshioka M, Kojima K, Yoshida H, Kawata M. A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Mol Biol*. 2004, 55(5): 687~700.
- [154]. Oono K. Test tube breeding of rice by tissue culture. *Trop Agric Res Series*. 1978, 11: 109 ~ 123.
- [155]. Oono K ,Niizeki M ,Senda M ,Ishikawa R ,Akada S ,HavadaT. An analysis of somaclonal variation in progenies regenerated from rice calli. *Rice Genetic Newsletter*. 1999, 16: 81~83.
- [156]. Orlicky S, Tang X, Willems A, Tyers M, Sicheri F. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* 2003, 112(2): 243~256.
- [157]. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal Variation-a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theor Appl Genet*. 1981, 60: 197~214.
- [158]. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994, 78(5): 773~785.
- [159]. Passmore LA, Booth CR, Venien-Bryan C, Ludtke SJ, Fioretto C, Johnson LN, Chiu W, Barford D. Structural analysis of the anaphase-promoting complex reveals multiple active sites and insights

- into polyubiquitylation. *Mol Cell* 2005, 20(6): 855~866.
- [160]. Peterhaensel C, Obermaier I, Rueger B. Non-radioactive Northern blot analysis of plant RNA and the application of different haptens for reprobing. *Anal Biochem.* 1998, 264(2): 279~283.
- [161]. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1695(1-3): 55~72.
- [162]. Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci.* 2000, 25(11): 544~548.
- [163]. Pilot G, Pratelli R, Gaymard F, Meyer Y, Sentenac H. Five-group distribution of the Shaker-like K<sup>+</sup> channel family in higher plants. *J Mol Evol.* 2003, 56(4): 418~434.
- [164]. Pratelli R, Lacombe B, Torregrosa L, Gaymard F, Romieu C, Thibaud JB, Sentenac H. A grapevine gene encoding a guard cell K<sup>+</sup> channel displays developmental regulation in the grapevine berry. *Plant Physiol.* 2002, 128(2): 564~577.
- [165]. Robinson PA, Ardley HC. Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci.* 2004, 117:5191~5194.
- [166]. Rocío González-Lamothe, Dimitrios I Tsitsigiannis, Andrea A Ludwig, Mireia Panicot, Ken Shirasu, Jonathan DG Jones. The U-Box Protein CMPG1 Is Required for Efficient Activation of Defense Mechanisms Triggered by Multiple Resistance Genes in Tobacco and Tomato. *Plant Cell* 2006, 18: 1067~1083.
- [167]. Rosenthal A, Jones DS. Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18(10): 3095~3096.
- [168]. Rudd MK, Schueler MG, Willard HF. Sequence organization and functional annotation of human centromeres. *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol.* 2003, 68: 141~149.
- [169]. Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 1998, 395(6699): 237~243.
- [170]. Ryu CH, You JH, Kang HG, Hur J, KimYH, Han MJ, An K, Chung BC, Lee CH, An G. Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. *Plant Mol Biol.* 2004, 54: 489~502.
- [171]. Rzeznicka K, Walker C J, Westergren T, Kannangara CG, Wettstein D, Merchant S, Gough SP, Hansson M. *Xantha-1* encodes a membrane subunit of the aerobic Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase involved in chlorophyll biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2005, 102(16): 5886~5891.
- [172]. Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem.* 2000, 275(9): 6252~6258.
- [173]. Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bes M, Piffanelli P, Piegu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Perin C, Sabau X, Ghesquiere A, Glaszmann JC, Delseny M, Guiderdoni E. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant J.* 2004, 39(3): 450~464.
- [174]. Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bes M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk P B F, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E. Highly efficient production and

- characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics Theor Appl Genet. 2003, 106: 1396~1408.
- [175]. Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush G S, Kitano H, Matsuoka M. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. Nature 2002a, 416: 701~702.
- [176]. Sasaki T, Matsumoto T, Yamamoto K, Sakata K, Baba T, Katayose Y, Wu J, Niimura Y, Cheng Z, Nagamura Y, Antonio BA, Kanamori H, Hosokawa S, Masukawa M, Arikawa K, Chiden Y, Hayashi M, Okamoto M, Ando T, Aoki H, Arita K, Hamada M, Harada C, Hijishita S, Honda M, Ichikawa Y, Idonuma A, Iijima M, Ikeda M, Ikeno M, Ito S, Ito T, Ito Y, Ito Y, Iwabuchi A, Kamiya K, Karasawa W, Katagiri S, Kikuta A, Kobayashi N, Kono I, Machita K, Maehara T, Mizuno H, Mizubayashi T, Mukai Y, Nagasaki H, Nakashima M, Nakama Y, Nakamichi Y, Nakamura M, Namiki N, Negishi M, Ohta I, Ono N, Saji S, Sakai K, Shibata M, Shimokawa T, Shomura A, Song J, Takazaki Y, Terasawa K, Tsuji K, Waki K, Yamagata H, Yamane H, Yoshiki S, Yoshihara R, Yukawa K, Zhong H, Iwama H, Endo T, Ito H, Hahn JH, Kim HI, Eun MY, Yano M, Jiang J, Gojobori T. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. Nature 2002b, 420: 312~316.
- [177]. Sato Y, Sentoku N, Miura Y, Hirochika H, Kitano H, Matsuoka M. Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants. EMBO J. 1999, 18(4): 992~1002.
- [178]. Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. Science 2001, 294: 109~115.
- [179]. Scott C. Peck, Thomas S. Nühse, Daniel Hess, Alejandro Iglesias, Fred Meins, Thomas Boller. Directed Proteomics Identifies a Plant-Specific Protein Rapidly Phosphorylated in Response to Bacterial and Fungal Elicitors. Plant Cell 2001, 13: 1467~1475.
- [180]. Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem Sci. 1999, 24(8): 311~316.
- [181]. Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. Science 1992, 256(5057): 663~665.
- [182]. Sentoku N, Kato H, Kitano H, Imai R. *OsMADS22*, a *STMADS11*-like *MADS-box* gene of rice, is expressed in non-vegetative tissues and its ectopic expression induces spikelet meristem indeterminacy. Mol Genet Genomics 2005, 273(1): 1~9.
- [183]. Sha Y, Li S, Pei Z, Luo L, Tian Y He C. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. Theor App Genet. 2004, 108: 306~314.
- [184]. Shen YW, Cai QH, Gao MW, LiangZQ. Isolation and genetic characterization of somaclonal mutants with large-sized grain in rice. Cereal Research Communications 1995, 23: 235~241.
- [185]. Shen YJ, Jiang H, Jin JP, Zhang ZB, Xi B, He YY, Wang G, Wang C, Qian L, Li X, Yu QB, Liu HJ, Chen DH, Gao JH, Huang H, Shi TL, Yang ZN. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. Plant Physiol. 2004, 135: 1198~1205.

- [186]. Shih SC, Prag G, Francis SA, Sutanto MA, Hurley JH, Hicke L. A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *EMBO J.* 2003, 22(6): 1273~1281.
- [187]. Shih SC, Sloper-Mould KE, Hicke L. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.* 2000, 19(2): 187~198.
- [188]. Singh K, Ishii T, Parco A, Huang N, Brar DS, Khush GS. Centromere mapping and orientation of the molecular linkage map of rice (*Oryza sativa* L.). *Proc Natl Acad Sci.* 1996, 93: 6163~6168.
- [189]. Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, Conrad MN, Conaway RC, Conaway JW, Elledge SJ, Harper JW. Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* 1999, 284(5414): 662~665.
- [190]. Sullivan B A, Blower M D, Karpen G H. Determining centro-mere identity: cyclical stories and forking paths. *Nature Rev Genet.* 2001, 2(8): 584~596.
- [191]. Sun ZX, Sun LH, Shu LH. Utilization of somaclonal variation in rice breeding. In Bajaj Y.P.S (Ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Rice*, Berlin: Springer-Verlag 1991, 14: 328~346.
- [192]. Sun Zong-xiu, Zhao Cheng-zhang, Zheng Kang-le, Qi Xiu-fang, Fu Ya-ping. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet.* 1983, 67: 67~73.
- [193]. Sun X, Le HD, Wahlstrom JM, Karpen GH. Sequence analysis of a functional *Drosophila* centromere. *Genome Res.* 2003, 13: 182~194.
- [194]. Sun X, Wahlstrom J, Karpen G. Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 1997, 91: 1007~1009.
- [195]. Takagi K, Ishikawa N, Maekawa M, Tsugane K, Iida S. Transposon display for active DNA transposons in rice. *Genes Genet Syst.* 2007, 82(2): 109~122.
- [196]. Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, Furuya M. Isolation and characterization of rice phytochrome A mutants. *Plant Cell* 2001, 13(3): 521~534.
- [197]. Tanaka K, Murata K, Yamazaki M, Onosato K, Miyao A, Hirochika H. Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall. *Plant Physiol.* 2003, 133(1): 73~83.
- [198]. Tani H, Chen X, Nurmberg P, Grant JJ, SantaMaria M, Chini A, Gilroy E, Birch PRJ, Loake GJ. Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Funct Integr Genomics* 4 2004, 258~266.
- [199]. Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length, variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 2001, 11: 1441~1452.
- [200]. Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16(16): 81~86.
- [201]. Tschopp J, Martinon F, Hofmann K. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol.* 1999, 9(10): 381~384.
- [202]. Tsugane K, Maekawa M, Takagi K, Takahara H, Qian Q, Eun CH, Iida S. An active DNA transposon nDart causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. *Plant J.* 2006, 45(1):46-57.

- [203]. Tsygankov AY, Teckchandani AM, Feshchenko EA, Swaminathan G. Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters. *Oncogene*. 2001, 20(44): 6382~6402.
- [204]. Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 2005, 437(7059): 693~698.
- [205]. Veilleux RE, Johnson AAT, Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews* 1998, 16: 229~268
- [206]. Klimyuk VI, Persello-Cartieaux F, Havaux M, Contard-David P, Schuenemann D, Meierhoff K, Gouet P, Jones JD, Hoffman NE, Nussaume L. A Chromodomain Protein Encoded by the *Arabidopsis* CAO Gene Is a Plant-Specific Component of the Chloroplast Signal Recognition Particle Pathway That Is Involved in LHCP Targeting. *Plant Cell* 1999, 11: 87~100.
- [207]. Vidal M, Endoh H. Prospects for drug screening using the reverse two-hybrid system. *Trends Biotechnol.* 1999, 17(9): 374~381.
- [208]. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999, 68: 1015~1068.
- [209]. Wang G, Yang J, Huibregtse JM. Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol.* 1999, 19(1): 342~352.
- [210]. Wang YS, Pi LY, Chen X, Chakrabarty PK, Jiang J, De Leon AL, Liu GZ, Li L, Benny U, Oard J, Ronald PC, Song WY. Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell* 2006, 18(12): 3635~3646.
- [211]. Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, Long Y, Zhong Y, Liu Y. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* 2006, 18: 676~687.
- [212]. Waye JS, Willard HF. Nucleotide sequence heterogeneity of alpha satellite repetitive DNA: A survey of alphoid sequences from different human chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15: 7549~7569.
- [213]. Wellburn AR. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant physiol.* 1994, 144: 307~313.
- [214]. Wirdnam C, Motoyama A, Arn-Boulidoires E, van Eeden S, Iglesias A, Meins F Jr. Altered expression of an ankyrin-repeat protein results in leaf abnormalities, necrotic lesions, and the elaboration of a systemic signal. *Plant Mol Biol.* 2004, 56(5): 717~730.
- [215]. Wu C, Li X., Yuan W., Chen G, Kilian A, Li J, Xu C, Li X, Zhou D, Wang S, Zhang Q. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant J.* 2003, 35: 418~427.
- [216]. Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada C, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, Fujii F, Shomura A, Ando T, Kono I, Waki K, Yamamoto K, Yano M, Matsumoto T,

- Sasaki T. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell* 2002, 14: 525~535.
- [217]. Wu J, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba MRS, Ramos-Pamplona M, Mauleon R, Portugal A, Ulat V J, Bruskiewich R, Wang G, Leach J, Khush G, Leung H. Chemical- and irradiation-induced mutants of *indica* rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol.* 2005, 59: 85~97.
- [218]. Wu J, Yamagata H, Hayashi-Tsugane M, Hijishita S, Fujisawa M, Shibata M, Ito Y, Nakamura M, Sakaguchi M, Yoshihara R, Kobayashi H, Ito K, Karasawa W, Yamamoto M, Saji S, Katagiri S, Kanamori H, Namiki N, Katayose Y, Matsumoto T, Sasaki T. Composition and structure of the centromeric region of rice chromosome 8. *Plant Cell* 2004, 16: 967~976.
- [219]. Xie QJ, Oard JH, Rush MC. Genetic analysis of an unstable, purple-red hull rice mutation derived from tissue culture. *J Hered.* 1995, 86: 154~156.
- [220]. Yamaguchi T, Nagasawa N, Kawasaki S, Matsuoka M, Nagato Y, Hirano HY. The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 2004, 16(2): 500~509.
- [221]. Yan H, Ito H, Nobuta K, Ouyang S, Jin W, Tian S, Lu C, Venu RC, Wang GL, Green PJ, Wing RA, Buell CR, Meyers BC, Jiang J. Genomic and genetic characterization of rice Cen3 reveals extensive transcription and evolutionary implications of a complex centromere. *Plant Cell* 2006, 18: 2123~2133.
- [222]. Yan H, Jiang J. Rice as a model for centromere and heterochromatin research. *Chromosome Res.* 2007, 15(1): 77~84.
- [223]. Yan H, Jin W, Nagaki K, Tian S, Ouyang S, Buell CR, Talbert PB, Henikoff S, Jiang J. Transcription and histone modifications in the recombination-free region spanning a rice centromere. *Plant Cell* 2005, 17: 3227~3238.
- [224]. Yan J, Wang J, Zhang H. An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J.* 2002, 29(2): 193~202.
- [225]. Yang CW, Gonzalez-Lamothe R, Ewan RA, Rowland O, Yoshioka H, Shenton M, Ye H, O'Donnell E, Jones JD, Sadanandom A. The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell* 2006, 18(4): 1084~1098.
- [226]. Yang Q, Liang C, Zhuang W, Li J, Deng H, Deng Q, Wang B. Characterization and identification of the candidate gene of rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* by mapping. *Planta* 2007, 225(2): 321~330.
- [227]. Yin Z, Wang G. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *Theor Appl Genet.* 2000, 100: 461~470.
- [228]. Yoshida S Y, Kazuhiko W, Morihiro F J. Non-random gameto-clonal variation in rice regenerants from callus subcultured for a prolonged period under high osmotic stress. *Euphytica* 1998, 104: 87 ~ 94.



- [229]. Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 2002, 296: 79~91.
- [230]. Zeng L, Yin Z, Chen J, Leung H, Wang GL. Fine genetic mapping and physical delimitation of the lesion mimic gene *Spl11* to a 160-kb DNA segment of the rice genome. *Mol Genet Genomics* 2002, 268(2): 253~261.
- [231]. Zeng LR, Qu S, Bordeos A, Yang C, Baraoidan M, Yan H, Xie Q, Nahm BH, Leung H, Wang GL. *Spotted leaf11*, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity. *Plant Cell* 2004, 16(10): 2795~2808.
- [232]. Zhang H, Li J, Yoo JH, Yoo SC, Cho SH, Koh HJ, Seo HS, Paek NC. Rice *Chlorina-1* and *Chlorina-9* encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Mol Biol.* 2006, 62(3):325~337.
- [233]. Zhang H, Scheirer DC, Fowle WH, Goodman HM. Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1992, 4(12): 1575~1588.
- [234]. Zhang Y, Zhang H, Liang J, Yu W, Shang Y. SIP, a novel ankyrin repeat containing protein, sequesters steroid receptor coactivators in the cytoplasm. *EMBO J.* 2007, May 3; [Epub ahead of print]
- [235]. Zhang Y, Huang Y, Zhang L, Li Y, Lu T, Lu Y, Feng Q, Zhao Q, Cheng Z, Xue Y, Wing RA, Han B. Structural features of the rice chromosome 4 centromere. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32: 2023~2030.
- [236]. Zhou HL, He SJ, Cao YR, Chen T, Du BX, Chu CC, Zhang JS, Chen SY. OsGLU1, a putative membrane-bound endo-1,4-beta-D-glucanase from rice, affects plant internode elongation. *Plant Mol Biol.* 2006, 60(1): 137~151.
- [237]. Zhu QH, Hoque MS, Dennis ES, Upadhyaya NM. Ds tagging of BRANCHED FLORETLESS 1 (BFL1) that mediates the transition from spikelet to floret meristem in rice (*Oryza sativa* L). *BMC Plant Biol.* 2003, 23: 3~6.
- [238]. Zweifel ME, Leahy DJ, Hughson FM, Barrick D. Structure and stability of the ankyrin domain of the *Drosophila* Notch receptor. *Protein Sci.* 2003, 12(11): 2622~2632.

## 附录 A 主要化学试剂、分子生物学试剂及仪器

## 1. 常用化学试剂

| 常用化学试剂             | 商品来源   |
|--------------------|--------|
| 十二烷基硫酸钠(SDS)       | 进口分装   |
| 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA)   | Sigma  |
| 三羟甲基氨基甲烷(Tris)     | Sigma  |
| 牛血清白蛋白(BSA)        | TaKaRa |
| 琼脂糖(Agrose)        | Sangon |
| 各种氨基酸              | Sangon |
| Gelrite            | Woko   |
| 潮霉素 (hygromycin B) | Roche  |

## 2. 分子生物学试剂

| 分子生物学试剂                     | 商品来源   |
|-----------------------------|--------|
| 多种限制性内切酶                    | MBI    |
| DNA 修饰酶                     | MBI    |
| TaqDNA 聚合酶                  | TaKaRa |
| QIAquick Gel Extraction Kit | QIAGEN |
| 质粒回收试剂盒                     | 博亚     |

## 3. 仪器

| 仪器                      | 商品来源                                     |
|-------------------------|--|
| 台式超速低温离心机               | Beckman                                  |
| 温度梯度培养箱                 | Nippon Medical & Chemical<br>Instruments |
| 恒温水浴箱                   | Pharmacia                                |
| 紫外可见两用分光光度计             | Beckman                                  |
| 平板、垂直板电泳仪               | BioRAD                                   |
| 垂直板电泳槽                  | 北京六一厂                                    |
| GeneAmp PCR System 9600 | Perkin-Elmer                             |
| 凝胶成像系统                  | 复日                                       |

超净工作台

苏净集团安泰公司

## 附录 B 主要培养基母液、缓冲液配方及配制方法

### 1 培养基配方

#### (1) LB 培养基

| 组成成分          | 加入量 | 单位  |
|---------------|-----|-----|
| Trypton       | 10  | g/L |
| Yeast extract | 5   | g/L |
| NaCl          | 10  | g/L |
| Agar          | 15  | g/L |
| pH 7.0        |     |     |

#### (2) YM 培养基

| 组成成分                            | 加入量 | 单位  |
|---------------------------------|-----|-----|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.5 | g/L |
| Mannitol                        | 10  | g/L |
| L-Glutamine                     | 2   | g/L |
| NaCl                            | 0.2 | g/L |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.2 | g/L |
| Yeast extract                   | 0.3 | g/L |
| Agar                            | 15  | g/L |
| pH 7.0                          |     |     |

### 2. 常用缓冲液、储藏液配方

#### (1) 10% SDS

10g 十二烷基硫酸钠溶于 90ml 水中，加热至 68℃ 溶解，加几滴浓盐酸调 pH 至 7.2，定容至 100ml，过滤除菌。

#### (2) 0.5 EDTA (pH8.0)

186.1g EDTA-Na<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 溶于 800 ml 水中，用 NaOH 调节 pH 至 8.0，定容至 1000ml。

#### (3) 1M Tris

在 800 ml 水中溶解 121.1g Tris 碱，加入浓 HCl 调节 pH 至所需值，定容至 1000ml。高压灭菌。

**(4) 50 TAE缓冲液**

| 组成成分                  | 加入量  | 单位 |
|-----------------------|------|----|
| Tris                  | 242  | g  |
| 冰醋酸                   | 57.1 | ml |
| 0.5 mol/L EDTA(pH8.0) | 100  | ml |

用水定容至1000 ml，用时稀释50倍。

**(5) 5 TBE 缓冲液：**

| 组成成分                 | 加入量  | 单位 |
|----------------------|------|----|
| Tris                 | 54   | g  |
| 硼酸                   | 27.5 | ml |
| 0.5mol/L EDTA(pH8.0) | 20   | ml |

加水定容至 1000ml，用时稀释 10 倍。

**(6) 碱裂解提取质粒 DNA 溶液**

| 试剂名称                       | 组成成分           | 加入量  | 单位     |
|----------------------------|----------------|------|--------|
| 溶液 I<br>高压灭菌 15 分钟，贮存于 4   | 葡萄糖            | 50   | mmol/L |
|                            | Tris.Cl(pH8.0) | 25   | mmol/L |
|                            | EDTA(pH8.0)    | 10   | mmol/L |
| 溶液 II                      | NaOH           | 0.2  | mol/L  |
|                            | SDS            | 1%   |        |
| 溶液 III<br>高压灭菌 15 分钟，贮存于 4 | 5mol/L KAc     | 60   | ml     |
|                            | 冰醋酸            | 11.5 | ml     |
|                            | 水              | 28.5 | ml     |

**(7) DNA 提取液**

| 组成成分          | 加入量  | 单位     |
|---------------|------|--------|
| Tris.Cl pH8.0 | 100  | mmol/L |
| EDTA pH8.0    | 50   | mmol/L |
| NaCl          | 500  | mmol/L |
| SDS           | 1.5% |        |

**(8) 0.5mg/ml 6-BA 母液的配法**

- ∅ 称取 100mg 6-BA 置于小烧杯中；
- ∅ 加少量的浓盐酸，用玻棒研磨成糊状，再加入少量浓盐酸，使之完全溶解；
- ∅ 用水稀释并定容至 200ml，4℃ 保存。

## 致 谢

2004年第一次在水稻所见到孙老师的时候,就觉得这个老师很有亲和力。花白的头发,走路像风一样,说话干脆利落,吃饭的时候还会和学生们一起谈天说地、笑论古今。转眼三年的时间过去了,历经努力终于走到了毕业这一天,值此之际,衷心感谢我的导师孙宗修研究员!本研究是在孙老师的悉心指导下完成的,从论文的选题、试验的设计实施到论文的写作都凝结着导师无数的心血和汗水。三年来孙老师不仅以开阔的学术眼界、渊博的专业知识、敏锐的科学洞察力引导、激励着我在求学路上步步前行,更重要的是他以严谨扎实的科学态度、孜孜不倦的求学精神、平易近人的处事原则教我如何在今后的人生路上严谨做事,踏实做人,使我受益终生。虽然实验工作几经坎坷,但是每次孙老师都在百忙之中抽出时间帮我分析原因,讨论解决方案;论文写作总是我白天写好,孙老师连夜修回,看着他认真负责的工作态度,敬佩之情油然而生;三年的艰辛是孙老师陪我走过每一天,帮助我,支持我。在此向孙老师致以我最崇高的敬意和最诚挚的感谢!

本论文主要是在中国水稻研究所国家重点实验室完成的。论文的顺利完成离不开本实验付亚萍老师、胡国成老师和斯华敏老师的热心帮助和支持;重点实验室颜红岚老师及科研处胡慧英老师也在很多方面给予了无私的帮助和关心;还有一起学习和奋斗过的卓仁英博士、汪得凯博士、李付振博士、栾维江博士、刘文真博士、吴超、刘文英、张洪、刘军、乔桂荣、梁亮、陈德源、卢大臣、陈恩助、沈丹丹、许杨锋、王维、郭书巧等同学以及秦志明、邱孝珍、潘小红、邓慧华、毛双珠及倪树彪、黄建生等科辅人员也给了我诸多帮助和关心,在此向各位表示深深的谢意。

在实验和论文的完成过程中,还得到了中国水稻研究所钱前研究员、吴建利研究员、郑康乐研究员、庄杰云研究员、陶龙兴研究员、朱旭东研究员及浙江省农科院的陶跃之研究员的大量帮助和热情指导,在此向各位老师表示真挚的感谢。

在钱前研究员实验室做实验的过程中,得到了张光恒、胡江、刘坚、薛大伟、姜华等老师和同学的帮助,中科院微生物研究所颜永胜、杨鹂同学,北京市农业科学院唐忠辉、权威、刘黎明、杨迪同学在水稻所期间也一起度过了一段愉快的时光,中国水稻研究所沈希宏、杜景红、张正波等同学在实验和生活给予了大量的帮助,在此一并致谢。

衷心的感谢父母多年来的养育之恩和对我学业一如既往的支持!感谢我的丈夫几年来对我的理解和帮助,让我全身心的投入工作中,顺利完成学业。

值此论文成稿之际,谨向所有关心和帮助过我的领导、老师和同学以及我的亲人、朋友致以最诚挚的谢意!

朱 丽

2007 年 5 月

## 作者简历

朱丽,女,党员,1978年11月生于山西省大同市。1997年9月至2001年7月就读于山西农业大学农学专业,同年修本校经济学专业第二学位,期间获优秀学生、优秀学生干部、运牌奖学金等奖励;2001年9月至2004年7月于山西农业大学,攻读生物化学与分子生物学专业硕士研究生,2002年冬至中国农业科学院生物技术研究所进行硕士论文研究工作,研究方向为微生物基因工程;2004年9月至今于中国农业科学院中国水稻研究所攻读生物化学与分子生物学专业博士研究生,研究方向为水稻功能基因组学。

### 攻读博士学位期间已发表或正在发表的文章

朱丽 刘文真 吴超 栾维江 付亚萍 胡国成 斯华敏 孙宗修,水稻着丝粒附近一个淡绿叶突变相关基因的定位分析,中国水稻科学,2007,21(3):228-234

朱丽,付亚萍,刘文真,胡国成,斯华敏,唐克轩,孙宗修,利用共转化和花药培养技术快速获得无选择标记的三价转基因水稻,中国水稻科学(已接收)

**ZHU Li**, FU Ya-ping, LIU Wen-zhen, HU Guo-cheng, SI Hua-min, Tang Ke-xuan, SUN Zong-xiu. Rapidly Obtaining the Marker-Free Transgenic Rice with Three Target Genes by Co-Transformation and Anther Culture, Rice Science (in press)

**ZHU Li**, LIU Wen-zhen, Wu Chao, LUAN Wei-jiang, FU Ya-ping, HU Guo-cheng, SI Hua-min, and SUN Zong-xiu. Identification and Fine Mapping of a Gene Related to Pale Green Leaf Phenotype near the Centromere Region in Rice (*Oryza sativa* L.) Rice Science (in press)

**Li Zhu**, Wenzhen Liu, Yaping Fu, Guocheng Hu, Huamin Si, Chao Wu, Zongxiu Sun, Identification and fine mapping of a thermo-sensitive yellow pale green leaf mutant in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet. (Submitted)

**Li ZHU**, Hong ZHANG, Wenzhen LIU, Guocheng HU, Yaping FU, Huamin SI, Weijiang LUAN, and Zongxiu SUN, A rapid reliable method of assaying T-DNA-inserted rice mutant lines, 5th International Rice Genetics Symposium and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium, 207, 2005

斯华敏,朱丽,牟仁祥,刘文真,胡国成,付亚萍,陈铭学,蔡宝立,孙宗修,表达细菌阿特拉津氯水解酶的转基因烟草对土壤中阿特拉津的生物降解,应用与环境生物学报(已投稿)

吴超,傅亚萍,朱丽,胡国成,斯华敏,刘文真,孙宗修转高赖氨酸蛋白基因脆茎水稻的收获指数及秸秆赖氨酸含量的研究 浙江农业科学(已接收)

Wenzhen Liu Yaping Fu Guocheng Hu Huamin Si **Li Zhu** Chao Wu Zongxiu Sun Identification and fine mapping of a thermo-sensitive chlorophyll deficient mutant in rice (*Oryza sativa* L.) Planta 2007,[Epub ahead of print].