

低能离子束辐照增强表达的水稻基因半定量分析

冯莹睿¹ 陈秋芳¹ 秦广雍¹ 押辉远^{1,2} 商淑培¹ 谷令彪¹ 倪奎奎¹

¹ (郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室 郑州 450052)

² (洛阳师范学院生命科学系 洛阳 471022)

摘要 应用基因芯片技术,发现了低能 N⁺离子束辐照处理下多个表达上调的水稻基因,其中有 5 个参与植物胁迫反应和调控细胞数量的基因: NBS-LRR1、NBS-LRR2、PGPS/D12、Pherophorin-S 前体物、天冬氨酸肽链内切酶。为了研究这 5 个基因在低能 N⁺离子束辐照水稻苗期的表达特征,采用半定量法检测不同剂量辐照下水稻萌发 72 h、96 h、120 h 时幼苗中这 5 个基因的表达水平。RT-PCR 结果表明,离子束辐照可显著地改变 NBS-LRR1、NBS-LRR2、PGPS/D12、Pherophorin-S 前体物及天冬氨酸肽链内切酶的转录水平,为研究离子束诱变的分子机制提供了目标基因。

关键词 离子束辐照, 水稻, 基因表达, 半定量 RT-PCR

中图分类号 Q691.8

自 20 世纪 80 年代中期余增亮等^[1]首次发现了离子注入的“马鞍”效应以来,离子束作为新的遗传诱变方法被广泛应用于生物体的改良。与传统辐射诱变源不同,低能离子束具有传能线密度(LET)高、尖锐的能量损失峰(Bragg 峰)、相对生物学效应大、损伤可修复性小等特点^[2]。因而低能离子束具传统辐射所没有的诱变率高、突变谱广和诱变损伤轻等优点。近年来人们对水稻^[3]、小麦^[4]、甜菊^[5]等离子辐照生物效应的研究发现,适当剂量的离子

注入可刺激幼苗生长、提高种子存活率、抗逆性、作物产量及品质,并利用这种有益突变已经育成多种高产、早熟、抗病虫、优质的农作物新品种^[6]。虽然利用低能离子束诱变育种取得了较好的经济效益,但目前对于低能离子束诱变产生的生物学效应的分子机制还不清楚,并且对其生物学机理研究较少。本实验室应用基因芯片分析低能 N⁺束辐照处理水稻的表达谱,发现一些参与植物胁迫反应和调控细胞数量的基因表达发生了显著的变化(表 1)。

Table 1 Part of different expressed gene between irradiation group and control group in genechip array ()

Probename	Gene description		P-value	FCAbsolute	Regulation
Os02g0262800	NBS-LRR protein(Fragment)	6×10 ¹⁷ vs C	0.0505	7.8	up
		6×10 ¹⁷ vs Z	0.0735	4.7	up
		Z vs C	0.3096	1.7	up
Os05g0365300	NBS-LRR protein(Fragment)	6×10 ¹⁷ vs C	0.0002	4.4	up
		6×10 ¹⁷ vs Z	0.0024	3.1	up
		Z vs C	0.7859	1.4	up
Os08g0499700	Conserved hypothetical protein	6×10 ¹⁷ vs C	0.3229	2.4	up
		6×10 ¹⁷ vs Z	0.2066	3.5	up
		Z vs C	0.0943	1.4	down
Os04g0330900	Conserved hypothetical protein	6×10 ¹⁷ vs C	0.0018	2.4	up
		6×10 ¹⁷ vs Z	0.2217	1.6	up
		Z vs C	0.2943	1.5	up
Os03g0830400	PGPS/D12	6×10 ¹⁷ vs C	0.2435	1.9	up
		6×10 ¹⁷ vs Z	0.2406	4.8	down
		Z vs C	0.1470	9.3	up

Note: C: control, Z: vacuum

国家自然科学基金(30800204)资助

第一作者: 冯莹睿, 女, 1987 年 12 月出生, 2009 级郑州大学在读研究生, 主要从事离子束生物效应的研究

通讯作者: 押辉远, Email: yahuiyuan@yahoo.com.cn

收稿日期: 初稿 2011-07-13, 修回 2011-12-15

其中 Os08g0499700 和 Os04g0330900 都是保守的假定蛋白，其功能未知。但对其保守序列分析发现 Os08g0499700 类似于 Pherophorin-S 前体，Os04g0330900 具有天冬氨酸型肽链内切酶活性。为了验证这五个基因的差异表达，本实验用低能 N^+ 束处理水稻种子，将不同剂量处理的水稻种子培养 72 h、96 h、120 h，提取水稻幼芽的 RNA，用 RT-PCR 检测这 5 个基因在离子束辐照处理组和对照组中的表达情况，以探究离子束辐照对基因转录水平的影响。

1 实验材料与方法

1.1 材料

水稻种子为本实验保存的新稻 18。

1.2 方法

1.2.1 低能离子束注入 选取均一、饱满的水稻种子，在 5 个相同的培养皿各放 200 粒，胚向上。其中一个为不做任何处理的对照组，另一个为真空组

(3×10^{-3} Pa)，另外 3 个为处理组，处理剂量分别为 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 、 $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 、 $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ ，离子能量为 30 keV(低能离子束注入机型号：UIL-0.512, TNV)。

1.2.2 RNA 的提取与质量的检测 将对照和处理的水稻种子进行 30℃ 暗培养，在 72 h、96 h、120 h 时分别取水稻幼芽，使用北京天恩泽基因科技有限公司的 Total RNA 提取试剂盒提取 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 的量。

1.2.3 第一条 cDNA 链的合成 每组取等量 RNA 作为模板，以 Oligod(T) 为引物，使用宝生物工程(大连)有限公司的 M-MLV 反转录酶(RNaseH⁻)合成第一条 cDNA 链，作为半定量 PCR 的模板。

1.3 PCR 引物设计

内参基因 Tubulin 的引物序列：F：5'GAGGGACTATGGCCGTTTAGG 3' R：5'CACTTCACCCGACCATTCAATGG 3' 参考 GeneBank 中 NBS-LRR1、NBS-LRR2、CHP1、CHP2、PD 的 mRNA 序列，用 Primer5.0 设计相应的 RT-PCR 引物(表 2)。

Table 2 Primers used in semi-quantitative RT-PCR experiments

Probename	Gene description	Primer(5'-3')	GeneBank accession
Os02g0262800	NBS-LRR protein (NBSLRR1)	F GAAGCGACCTCCTACCAGC R TAGACACGCAAACCCAGAC	AK073576
Os05g0365300	NBS-LRR protein (NBSLRR2)	F TAGCGAAAGCAAGGGACT R AATGGAGACAACGAAACG	AK120289
Os08g0499700	Conserved hypothetical protein(CHP1)	F GTTGCTGTTGGAGGAAGTAT R AGGAGCCAGAATCTGTAGTG	AK119271
Os04g0330900	Conserved hypothetical protein(CHP2)	F CGTTAAATAGCGTCATCTC R CAAACAACCGATTAAGTGC	AK065565
Os03g0830400	PGPS/D12(PD)	F AGGTAGTCAGATTGCCAGGAT R TGAGAAAGGCTCCCAGGTC	CI422497

1.4 半定量 PCR

先扩增内参基因 Tubulin，均一化不同处理样本的 cDNA 浓度，随后再用 NBS-LRR1、NBS-LRR2、CHP1、CHP2、PD 引物进行 PCR 反应。

PCR 反应体系：10×EasyTaq buffer 2.5 μL ，上下游引物各 0.5 μL ，cDNA 2 μL ，Taq 酶 0.2 μL ，加灭菌水补至 25 μL 。反应程序：94℃ 4 min，94℃ 30 s，48℃–53℃ 30 s，72℃ 30 s，72℃ 10 min，Tubulin 为 28 个循环，NBS-LRR1、NBS-LRR2、CHP1、CHP2、PD 为 35 个循环。

2 结果与分析

2.1 水稻不同样本的总 RNA 检测

经琼脂糖电泳检测，结果显示水稻不同样本提取的总 RNA 的 28S 和 18S rRNA 条带清晰(图 1)，没有基因组 DNA 和蛋白质的污染，表明提取的不同样本总 RNA 质量较好。

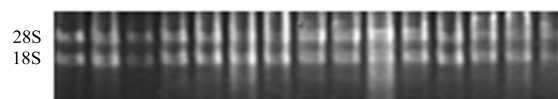


Fig.1 The RNA results of rice

2.2 半定量 RT-PCR

利用半定量 RT-PCR 方法检测了 5 个基因在离子束辐照处理组、真空组和对照组中的表达情况(图 2)。结果显示,经低能离子束注入培养 72 h 后,三个剂量组的 NBSLRR1 转录量均显著高于对照组和真空组,并且随剂量的增加而增高;96 h 后 NBSLRR1 的转录量在 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 低剂量组中增高,在 $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 和 $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 高剂量组中反而降低;NBSLRR1 在真空组的转录量呈先降再增再降的规律,并 96 h 时达到最高。

NBS-LRR2 在 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组的转录水平呈先增高后降低再增高的趋势; $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 、 $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组在 96 h 前有较高水平的转录,96 h 后其转录减弱;其在真空组的转录水平则呈先降再增再降的趋势,并在 96 h 时达到最高。

在研究的三个时期中,CHP1 在 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组的转录水平呈现出先增高后降低再增高的趋势, $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组在各时期内也均有连续性表

达,然而在 $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组和真空组中,CHP1 只分别在 72 h、96 h 有较高的转录活性。

CHP2 在 72 h、96 h、120 h 的表达模式基本相同,其在真空组和三个处理组中的表达量都要高于对照组。且除 72 h 外,其在真空组和三个处理组的表达量差别不大。CHP2 在 72 h 时真空组和 $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组的转录水平相对其他两个剂量组稍高,而 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 和 $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组的表达量则相同。

PD 在 72 h 和 96 h 真空组的转录水平显著高于对照组和三个处理组,96 h 后其转录量逐渐降低。72 h 时三个处理组 PD 的转录水平同对照组无明显的差别。 $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组在 96 h 时 PD 的转录活性有所增强,但其转录量仍稍低于真空组,96 h 后其转录量继续降低。 $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组其在 120 h 时才显现出高的转录活性。 $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ 剂量组的 PD 的转录一直未有明显的增加,反而在 120 h 时有所降低。

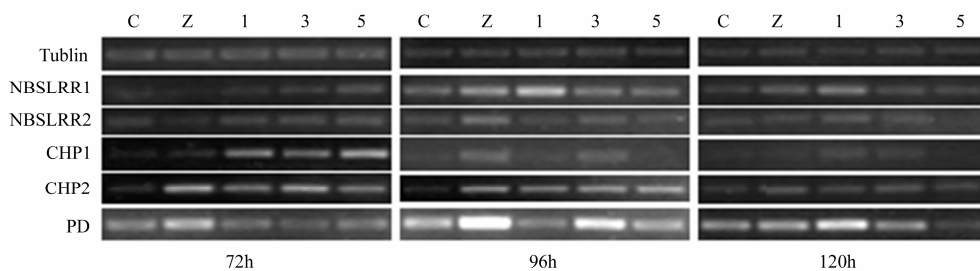


Fig.2 RT-PCR results of NBSLRR1, NBSLRR2, CHP1, CHP2, and PD ranging from 72 to 120 h(C, control; Z, vacuum; 1, $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ dose; 3, $3 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ dose; 5, $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ dose)

3 讨论

上调基因 NBS-LRR1、NBS-LRR2 编码的蛋白都为假定的 NBS-LRR 类蛋白,同属于 P-loop NTPase 超家族,具有 NBS-LRR 蛋白保守的 P-loop 结构。NBS-LRR 类蛋白是植物最为庞大的一类抗病蛋白,其在抗病反应中主要监测病原菌及参与抗病反应的信号传导^[7]。水稻的白叶枯病抗性基因 Xal^[8]、拟南芥的丁香假单胞菌抗性基因 RPS5^[9]、水稻稻瘟病抗性基因 Pita、Pi9、Pi37 和 PiB^[10-13]等都属于 NBS-LRR 类抗病基因,当受到病原菌的感染则会诱导激活相关抗病基因的表达。本实验发现低能 N^+ 注入后可增强 NBS-LRR1、NBS-LRR2 的转录活性,初步推测其转录活性的提高可能是细胞对低能 N^+ 注入刺激的一种强烈的应激反应。

CHP1 编码的蛋白类似于 Pherophorin-S 前体物, Pherophorin-S 前体物可通过自我组装和交叉耦合合成 Pherophorin-S^[14]。Pherophorin-S 是团藻细胞

外基质的可溶性糖蛋白,参与团藻性别分化过程的细胞外基质的 DZ 区域的结构形成^[15]。Hallmann^[16]研究表明 Pherophorin-S 不仅具有结构功能,在受到环境因素如机械损伤的影响下诱导 Pherophorin-S 基因的表达,这暗示了 Pherophorin-S 可能参与抵抗机械损伤反应。而本实验中低能 N^+ 注入后 Pherophorin-S 前体物的高转录水平可能与低能 N^+ 注入造成胚细胞损伤的细胞修复反应有关。

PGPS/D12 也称细胞数量调控子,属于富含半胱氨酸的 PLAC8 家族,在拟南芥的花粉及玉米的胚芽鞘、叶、茎、根中表达。这类细胞数量调控子主要调控着植物的生长、器官的大小及产量^[17]。并且人们研究发现真空和低剂量的离子注入可刺激水稻幼苗的生长^[18],这可能与真空和低剂量的离子注入中 PGPS/D12 的转录水平提高有着某种关联。

CHP2 编码的蛋白为保守序列,具有天冬氨酸蛋白酶活性。植物天冬氨酸蛋白酶主要参与植物蛋

白质的加工、降解过程,且在植物衰老、抗病反应、细胞程序性死亡和细胞繁殖中起着关键性的作用^[19]。有研究表明,植物在遭受到干旱、缺氧、物理损伤或病原菌等生物或非生物胁迫性则会诱导天冬氨酸蛋白酶的表达^[20-24],高表达的天冬氨酸蛋白酶可能参与由于胁迫产生的错误折叠或修饰的蛋白的降解,为合成其他蛋白提供氨基酸。Prasad B D 等研究表明天冬氨酸蛋白酶 CDR1 的过表达^[25],可增强对细菌和真菌病原体的抗性并诱导抗病相关基因的表达。本实验也发现低能 N^+ 的注入可激活 CHP2 编码的天冬氨酸蛋白酶的转录活性,这可能是细胞对离子束胁迫的抗逆反应的一种表现。

带电离子束注入生物体后,会诱发各方面效应,包括物理效应、化学效应和生物效应。之前的研究着重于从物理效应方面探讨离子注入诱变机理,并提出了动量、能量和质量沉积生物效应的概念^[26]。然而在离子束辐照对基因转录的影响这方面的研究较少。本文首次探讨了一些涉及胁迫反应和调控细胞繁殖的基因在低能离子束注入水稻中转录水平,并发现离子束可激活参与抗逆反应相关基因的表达,为深入揭示离子束诱变的分子机制奠定了基础。但生物性状的变化不仅与转录水平的变化有关,也与生物性状的实现过程紧密相关。因此,还应进一步研究这些基因编码的蛋白在蛋白质翻译和翻译后水平的变化,从而揭示离子注入生物体的遗传诱变机理。

参考文献

- 1 余增亮. 离子束生物技术引论. 安徽科学技术出版社. 1998
YU Zengliang. Introduction to ion beam biotechnology, Anhui Science & Technology Publishing House, 1998
- 2 Tanaka A, Shikazono N, Hase Y. Studies on Biological Effects of Ion Beams on Lethality, Molecular Nature of Mutation, Mutation Rate, and Spectrum of Mutation Phenotype for Mutation Breeding in Higher Plants. *Ion Beam-induced Mutation in Plants*. 2010, **51**: 223-233
- 3 周新伟, 陈益海, 刘敬阳, 等. 离子束生物技术在粳稻育种中的应用. *江苏农业科学*. 2003(04): 1-3
ZHOU Xinwei, CHEN Yihai, LIU Jingyang, *et al.* Application of ion beam biotechnology in rice breeding. *Jiangsu Agricultural Sciences*. 2003(04): 1-3
- 4 雍志华, 林锡刚, 汪仕元, 等. 超低能离子束处理小麦种子生物学效应的初步分析. *西南农业学报*. 2002, **15**(4): 119
YONG Zhihua, LIN Xigang, WANG Shiyuan, *et al.* Preliminary analysis of biological effect of ultra-low-energy ionic beams on wheat seeds. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*. 2002, **15**(4): 119
- 5 曾宪贤, 王燕飞, 张石峰, 等. 离子注入甜菜种子生物效应. *科学通报*. 1999, **44**(4): 382-384
ZENG Xianxian, WANG Yanfei, ZHANG Shifeng, *et al.* Biological Effect of N^+ Injection on Sugar Beet Seed. *Chinese Science Bulletin*. 1999, **44**(4): 382-384
- 6 龚洪恩, 吕芳德. 离子束生物技术在植物育种中的应用. *经济林研究*. 2008, **26**(1): 113-116
GONG Hongen, LV Fangde. Application of Ion Beam Bio-technique in Plant Breeding. *Nonwood Forest Research*. 2008, **26**(1): 113-116
- 7 De Young B J, Innes R W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*. 2006, **7**: 1243-1249
- 8 Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, *et al.* Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, **95**(4): 1663-1668
- 9 Ade J, De Young B J, Golstein C, *et al.* Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *PNAS*. 2007, **104**: 2531-2536
- 10 Bryan G T, Wu K S, Farrall L, *et al.* A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*. 2000, **12** (11): 2033-2046
- 11 Qu S, Liu G, Zhou B, *et al.* The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics*, 2006, **172**(3): 1901-1914
- 12 Lin F, Chen S, Que Z, *et al.* The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome. *Genetics*, 2007, **177**(3): 1871-1880
- 13 Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, *et al.* The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 1999, **19**(1): 55-64
- 14 Ender F, Godl K. Evidence for Autocatalytic Cross-Linking of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins during Extracellular Matrix Assembly in *Volvox*. *Plant Cell*, 2002, **14**: 1147-1160
- 15 Godl K, Hallmann A, Wenzl S, *et al.* Differential targeting of closely related ECM glycoproteins: the pherophorin

- family from *Volvox*. The EMBO Journal, 1997, **16**(1): 25-34
- 16 Hallmann A. Extracellular matrix and sex-inducing pheromone in *Volvox*. International review of cytology, 2003, **227**: 131-182
 - 17 Guo M, Rupe M A, Dieter J A, *et al.* Cell Number Regulator1 Affects Plant and Organ Size in Maize: Implications for Crop Yield Enhancement and Heterosis. Plant Cell, 2010, **22**(4): 1057-1073
 - 18 王卫东, 王宁, 苏明杰, 等. 离子注入过程中真空和温度对小麦幼苗生长的影响. 河南农业科学, 2006: 36-38
WANG Weidong, WANG Ning, SU Mingjie, *et al.* Effects of Vacuum and Temperature on Wheat Seedlings during Ion Beam Implantation. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2006: 36-38
 - 19 Simões I, Faro C. Structure and function of plant aspartic proteinases. European Journal of Biochemistry, 2004, 271: 2067-2075
 - 20 Carvalho M H C, d'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, *et al.* Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. FEBS Lett, 2001, **492**: 242-246
 - 21 Palma J M, Sandalio L M, Corpas F J, *et al.* Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant Physiol. Biochem, 2002, **40**: 521-530
 - 22 Schaller A, Ryan C A. Molecular cloning of a tomato leaf cDNA encoding an aspartic protease, a systemic wound response protein. Plant Molecular Biology, 1996, **31**: 1073-1077
 - 23 Rodrigo I, Vera P, Conejero V. Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. Eur. J. Biochem, 1989, **184**: 663-669
 - 24 Rodrigo I, Vera P, Vanloon L C. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins-evidence for conserved mechanisms of degradation of pathogenesis-related proteins in plants. Plant Physiol, 1991, **95**: 616-622
 - 25 Prasad B D, Creissen G, Lamb C, Chattoo B B. Overexpression of rice (*Oryza sativa* L.) OsCDR1 leads to constitutive activation of defense responses in rice and Arabidopsis. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, **22**(12): 1635-1644
 - 26 Yu Z L, Deng J G, He J J. Mutation breeding by ion implantation. Nucl Instr Meth Phys Res, 1991, **59**: 705-708

Semi-quantitative analysis of the five up-regulated genes in rice screened by genechip array underlying the implantation of the low-energy ion beams

FENG Yingrui¹ CHEN Qiufang¹ QIN Guangyong¹
YA Huiyuan^{1,2} SHANG Supei¹ GU Lingbiao¹ NI Kuikui¹

¹(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

²(College of Life Sciences Luoyang, Normal University, Luoyang 471022, China)

ABSTRACT We select abnormal expression genes from the gene chips which detected the nitrogen ion beam irradiated rice, and these genes (NBS-LRR, PGPS/D12, Pherophorin-S, aspartic endopeptidase) involve in stress response and cell number regulation. In order to investigate the characters of these genes expression in rice seedlings stage irradiated by the low-energy iron beam, mRNA were purified from seedlings at different growth stages ranging from 72 to 120 h after implantation (HAI) and analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that different implantation doses could regulate expression level of NBS-LRR1, NBS-LRR2, Pherophorin-S precursor, Aspartic endopeptidase and PGPS/D12, providing the target genes for the molecular mechanism of ion beam mutation.

KEYWORDS Ion beam irradiation, Rice, Gene expression, Semi-quantitative RT-PCR

CLC Q691.8