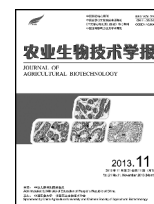




Online system: <http://www.jabiotech.org>  
 农业生物技术学报  
**Journal of Agricultural Biotechnology**  
 2013, 21(11): 1287~1294  
 DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2013.11.004



研究报告

Letter

## DUF966 家族中一个胁迫抑制基因 *OsDSR4* 的表达分析及超表达转基因水稻的获得

罗成科<sup>1,2</sup> 郭迟鸣<sup>1</sup> 张玉霞<sup>1</sup> 陈继林<sup>1</sup> 肖世民<sup>1</sup> 陈亮<sup>1\*</sup>

1 厦门大学生命科学学院/厦门市植物遗传重点实验室, 厦门 361005; 2 宁夏大学新技术应用研究开发中心, 银川 750021

\*通讯作者, [chenlg@xmu.edu.cn](mailto:chenlg@xmu.edu.cn)

**摘要** *OsDSR4* 基因是 DUF966 基因家族中的一个未知功能基因, 目前其生物学功能尚不清楚。本研究生物信息学分析显示, *OsDSR4* 基因 cDNA 全长 2 167 bp, 包含一个 1 149 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 382 个氨基酸, 推测的蛋白中包含一个高度保守的 DUF966 结构域; 表达模式分析表明, *OsDSR4* 主要在水稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) 的茎节间和叶片中表达, 干旱、高盐和低温等非生物胁迫明显抑制了 *OsDSR4* 的表达, 而脱落酸(abscisic acid, ABA)则显著诱导了它的表达; 利用重叠延伸 PCR 方法成功克隆了 *OsDSR4*, 并将其转化进水稻中, 获得了 32 株超表达转基因植株。分子鉴定结果表明, 该基因已被整合进水稻基因组中, 并在部分转基因植株中实现了超量表达。本实验为进一步开展 *OsDSR4* 基因的生物学功能研究提供了基础资料。

**关键词** *OsDSR4*, DUF966, 非生物胁迫, 基因表达, 转基因水稻

## Expression Analysis of a Stress Repressed Gene *OsDSR4* from DUF966 Family and Generation of *OsDSR4*-overexpressing Transgenic Rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)

LUO Cheng-Ke<sup>1,2</sup> GUO Chi-Ming<sup>1</sup> ZHANG Yu-Xia<sup>1</sup> CHEN Ji-Lin<sup>1</sup> XIAO Shi-Min<sup>1</sup> CHEN Liang<sup>1\*</sup>

1 School of Life Sciences, Xiamen University/Xiamen Key Laboratory for Plant Genetics, Xiamen 361005, China; 2 Development Center of New Technique Application and Research, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

\* Corresponding author, [chenlg@xmu.edu.cn](mailto:chenlg@xmu.edu.cn)

**Abstract** *OsDSR4* is a gene of unknown function in DUF966 gene family, and the function of DUF966 family genes have not been reported until now. In this study, the bioinformatic analysis showed that the cDNA of *OsDSR4* had 2 167 bp containing an open reading frame (ORF) of 1 149 bp, and it encoded a putative protein of 372 amino acids with a highly conserved DUF966 domain. The gene expression profile analysis indicated that *OsDSR4* was expressed mainly in internode and leaf blade of rice (*Oryza sativa* L.), and it was repressed markedly by drought, salt and cold stresses, and induced significantly by abscisic acid (ABA). *OsDSR4* was cloned using overlap extension PCR, and the fusion construct containing *OsDSR4* was introduced into rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) by *Agrobacterium*-mediated transformation method. Thirty-two *OsDSR4*-overexpressing transgenic plants were obtained and identified by PCR and qRT-PCR, which was demonstrated

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)前期研究专项(No. 2012CB126312)

收稿日期: 2013-06-18 接受日期: 2013-07-19

that *OsDSR4* had been integrated into rice genome and was overexpressed in some positive transgenic plants. These results establish the foundation for further study of the precise function of *OsDSR4*.

**Keywords** *OsDSR4*, DUF966, Abiotic stress, Gene expression, Transgenic rice

水稻是我国乃至全世界最重要的粮食作物之一,生长和产量经常受到干旱、盐碱和低温等非生物胁迫的影响。深入开展功能基因组研究可从本质上更好地揭示水稻抗逆机制,便于培育优良的抗逆品种,对水稻的高产稳产具有重要意义。近年来,国内外研究人员已分离克隆了许多胁迫诱导表达基因,并系统地阐释了其抗逆生物学功能(Hu et al., 2006; Seo et al., 2011; Jan et al., 2013),然而人们对胁迫抑制基因的功能知之甚少,Huang等(2008a)和Huang等(2009)分别报道了*SRZ1*和*DST*基因负向参与调控了植物抗逆性,足见胁迫抑制基因在植物非生物胁迫响应中也起着较为重要的作用。因此,解析胁迫抑制表达基因的功能有助于更好地理解水稻抗逆分子机制。

当前,Pfam数据库中收集了3000多个未知功能结构域(DUF)蛋白家族,是一大群功能并未表征的蛋白家族(Punta et al., 2012)。大量转录谱和蛋白谱分析发现这些DUF蛋白在生物的生命过程中发挥着重要作用,对这些基因功能的研究将有助于深入了解生物体复杂的生命活动机制,因此具有重要意义(秦丹丹等, 2013)。近几年关于不同DUF家族基因的功能研究报道愈来愈多,例如在植物生长发育方面,DUF579家族基因*IRX15*和*IRX15-L*及*AtGXMT1*参与了半纤维素木聚糖的合成,影响了拟南芥次生细胞壁的结构建成(Jensen et al., 2011; Urbanowicz et al., 2012); DUF642家族基因*DGR1*和*DGR2*参与了拟南芥对抗坏血酸合成末端前体L-GalL的响应,并互补表达影响着拟南芥叶的伸展和根的伸长(Gao et al., 2012); DUF640家族基因*TH1*主要在小穗的幼小花序和内外稃中表达,它在控制水稻内外稃发育过程中起着主要作用(Li et al., 2012)。在植物防御反应和胁迫响应方面,例如2个RING-DUF1117 E3泛素连接酶基因*AtRDUF1*和*AtRDUF2*受干旱和脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导,与野生型相比,这2个基因的单、双突变体表现出降低了ABA依赖的抗旱性(Kim et al., 2012); Kim等(2009)利用蛋白质组学方法对用稻瘟病及其诱导子处理的悬浮细胞进行了差异蛋白质组分析,鉴定了5个DUF26稻瘟病响应蛋白,并利用RT-

PCR分析了5个DUF26基因的表达模式,结果表明其参与了水稻对稻瘟病的防御反应。

DUF966家族是众多DUF蛋白家族之一,数据库分析结果显示该家族广泛分布于植物中,其中在模式植物水稻和拟南芥中分别有7和5个成员,该家族基因编码的蛋白质包含1~2个高度保守的DUF966结构域,目前尚未见DUF966家族基因的生物学功能报道。Tirajoh(2005)在研究耐盐基因筛选时,从盐胁迫处理的西红柿根中分离到一个包含DUF966结构域的*JWL19*基因,Northern杂交结果表明*JWL19*基因的转录水平能够在2h盐胁迫时检测到(显著上调),但在其他时间点的胁迫下并未检测到。这一报道为开展DUF966家族基因参与水稻非生物胁迫响应提供了信息。

公共芯片数据(GSE6901)表明水稻DUF966家族基因中的大部分成员受多个非生物胁迫的抑制表达,暗示该家族基因可能负向参与调控水稻对非生物胁迫的响应。为了解DUF966家族基因的生物学功能,本实验选择了该家族中的一个基因LOC\_Os03g09200.1(*OsSRD4*, DUF966-stress repressive gene 4 in *Oryza sativa*)作为研究对象,利用生物信息学手段分析了*OsSRD4*基因及其编码蛋白质的结构,应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术分析了该基因在不同组织及逆境胁迫下的表达模式,通过重叠延伸PCR技术克隆了*OsSRD4*基因的完整ORF,构建了超表达重组载体并获得了超表达转基因水稻植株,这些结果为进一步研究该基因的生物学功能提供基础资料。

## 1 结果与分析

### 1.1 *OsDSR4*基因及其编码蛋白质的生物信息学分析

通过搜索RGAP和GRAMENE数据库,获得了*OsDSR4*基因及其编码的蛋白序列。*OsDSR4*基因位于水稻第3号染色体上,其基因组序列全长为6564bp,包含着5个外显子和4个内含子。cDNA全长为2167bp,包含一个1149bp的ORF和一个1018bp的3'非编码区。*OsDSR4*基因编码382个氨基酸残基蛋白质,推测的蛋白质分子量为41.85

kD, 等电点为 8.45。利用 NCBI 的 CDD 数据库对 *OsDSR4* 基因编码的蛋白进行保守区预测, 结果表明该蛋白含有一个保守的功能未知结构域 DUF966, 位于第 40~332 位氨基酸残基, 通过 Pfam 数据库确证 *OsDSR4* 属于 DUF966 超家族成员; TMHMM 和 WoLF PSORT 在线工具预测表明 *OsDSR4* 蛋白没有跨膜区, 亚细胞定位于细胞核中。

### 1.2 *OsDSR4* 在水稻扬花期不同组织中的表达模式

RiceXPro 数据库中的芯片数据分析表明 *OsDSR4* 基因主要在水稻花序 (inflorescence\_3.4-4.0mm) 中表达, 具有一定的组织特异性。为了研究 *OsDSR4* 的组织模式, 本研究利用 qRT-PCR 检测了该基因在水稻扬花期不同组织中的表达。结果如图 1 所示, *OsDSR4* 在根、茎节间、茎节、叶片、花序、叶鞘、叶枕和叶舌中均有表达, 其中茎节间和叶片中的表达量明显高于其他组织, 在根、茎节和叶枕中的表达量次之, 而在花序、叶鞘和叶舌中表达量较低, 其中茎节间中表达量是花序的 12.8 倍, 这些结果表明 *OsDSR4* 基因的表达具有一定的组织差异性。

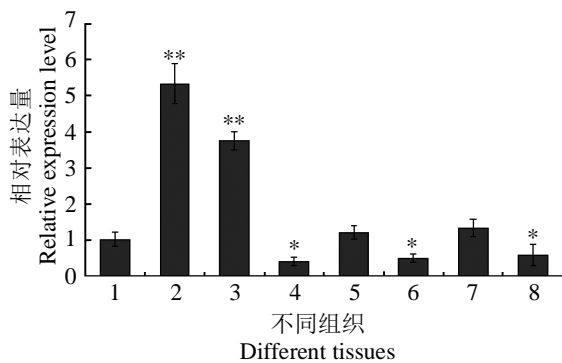


图 1 *OsDSR4* 在水稻扬花期不同组织中的表达  
 Figure 1 The expression of *OsDSR4* in different tissues from rice at flowering stage

1: 根; 2: 茎节间; 3: 叶片; 4: 整个小穗; 5: 茎节; 6: 叶鞘; 7: 叶枕; 8: 叶舌。其中 2、3、5、6、7 和 8 分别为植株前三节间各自组织的混合物; *Actin* 为内参基因, n=3; \* 和 \*\* 分别代表根与其他组织之间在  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  时有显著性差异  
 1: Root; 2: Stem internode; 3: Leaf blade; 4: Inflorescence; 5: Stem node; 6: Leaf sheath; 7: Pulvinus; 8: Ligule. Among these tissues, 2, 3, 5, 6, 7 and 8 represents the mixture of the first three of stem internode, leaf blade, stem node, leaf sheath, pulvinus and ligule, respectively; Reference gene: *Actin*, n=3; \* and \*\* indicates that significant difference was detected between root and other tissues at  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ , respectively

### 1.3 *OsDSR4* 在不同胁迫下的表达模式

为了研究 *OsDSR4* 是否参与非生物胁迫应答, 利用 qRT-PCR 方法分析了干旱、高盐、低温和 ABA 等非生物胁迫条件下水稻幼苗叶片中 *OsDSR4* 的表达模式。结果如图 2 所示, *OsDSR4* 的表达明显受干旱、高盐和低温抑制, 而受 ABA 诱导。具体表现为: 干旱胁迫 1 h, *OsDSR4* 被快速下调至较低的表达水平, 然后逐渐上调, 至 12 h 表达水平略高于对照, 24 h 又迅速下调至最低水平 (图 2A); *OsDSR4* 在受到盐胁迫时表现出逐步下调趋势, 胁迫 6 h 表达量达到最低值, 12 h 表达量有所回升, 但到 24 h 表达量又降低至最低值 (图 2B); 对于低温胁迫, *OsDSR4* 的表达量在受到胁迫 1 h 快速下调至最低水平, 随着胁迫时间的加长, 表达水平逐步上调, 至 24 h 接近最初表达水平 (图 2C)。相比于前三种非生物胁迫处理, *OsDSR4* 在逆境信号分子 ABA 胁迫处理下表现出相反的表达模式, 即 *OsDSR4* 的表达呈上调趋势, 具体为 *OsDSR4* 在 0.5 h ABA 胁迫明显诱导, 在 6 h 表达量达到最大值, 之后短暂下调, 24 h 表达量上调至较高水平 (图 2D)。这些结果表明 *OsDSR4* 参与了水稻对干旱、高盐、低温和 ABA 的应答反应。

### 1.4 *OsDSR4* 基因的克隆及超表达载体的构建

以水稻不同时期各组织的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 均未扩增到 *OsDSR4* 基因。查询 Genevestigator 数据库中的芯片数据, 发现 *OsDSR4* 基因是一个低丰度表达基因。因此, 本研究以叶片基因组 DNA 为模板, 分段扩增该基因的每个外显子片段, 通过重叠延伸 PCR 方法拼接各片段, 最终获得了 *OsDSR4* 基因的完整 ORF 片段。将此片段先克隆到 pENTR™/D-TOPO® 入门载体中, 经测序验证正确后重组进表达载体 pH7WG2, 对重组载体进行 PCR 检测和酶切鉴定, 结果表明该基因已被成功构建到表达载体中。

### 1.5 *OsDSR4* 超表达转基因水稻的获得及分子鉴定

通过农杆菌介导的转化方法将构建好的 *OsDSR4* 超表达重组载体导入水稻 ZH11 中, 共获得了 32 株超表达转基因植株 (图 3)。以水稻叶片基因组 DNA 为模板, 利用 *hpt* 基因特异引物对 T<sub>0</sub> 代转基因植株进行 PCR 检测, 结果表明 pH7WG2 质粒和大多数转基因水稻能扩增出与预期片段大小一致

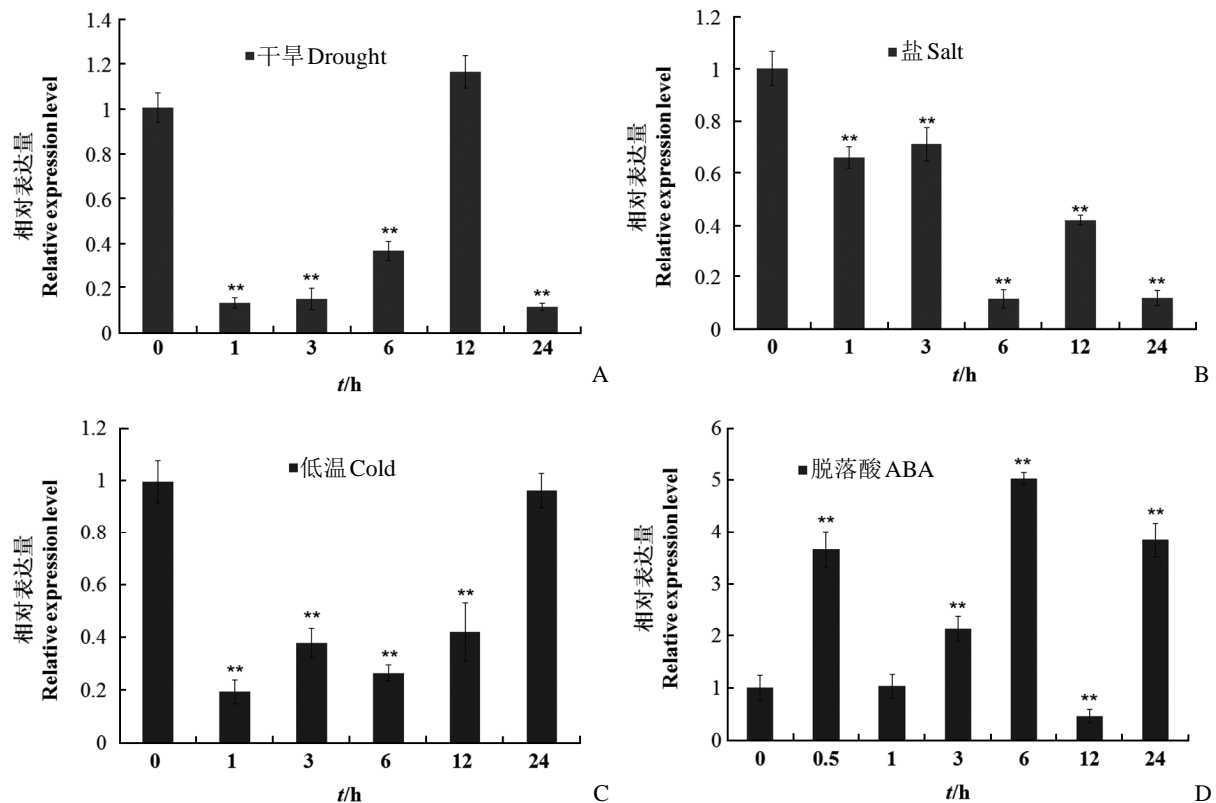


图2 *OsDSR4* 基因的逆境表达模式分析

Figure 2 The adversity expression profile analysis of *OsDSR2* in rice seedlings

内参基因: *Actin*,  $n=3$ ; \*\*代表各胁迫处理样品与对照之间在  $P < 0.01$  有显著性差异

Reference gene: *Actin*,  $n=3$ ; \*\* indicates that a significant difference was detected between stress-treated samples and untreated control at  $P < 0.01$

的目的片段,而野生型和个别转基因水稻却不能扩增出目的片段(图4),转基因阳性率高达88%,初步说明目的基因已成功整合进水稻基因组中。对鉴定为阳性的转基因水稻进行了qRT-PCR分析,结果表明,*OsDSR4*基因已在部分转基因植株中得到了超量表达(图5)。

## 2 讨论

DUF966 家族成员的有关信息主要来源于数据库中芯片数据的分析和功能注释,目前该家族成员的生物学功能尚未见报道。近两年 Kim 等(2012)和秦丹丹等(2013)的研究报道已然表明 DUF 家族基因参与了植物非生物胁迫响应和耐受性,结合对芯片数据(GSE6901)中 DUF966 家族成员参与水稻非生物胁迫响应的分析结果,本研究认为解析 DUF966 家族基因在水稻非生物胁迫响应中的作用很有必要。



图3 *OsDSR4* 超表达转基因水稻

Figure 3 *OsDSR4*-overexpressing transgenic rice

已有研究显示,一些胁迫响应基因在受多种非生物胁迫诱导表达的同时,也会受至少一种非生物

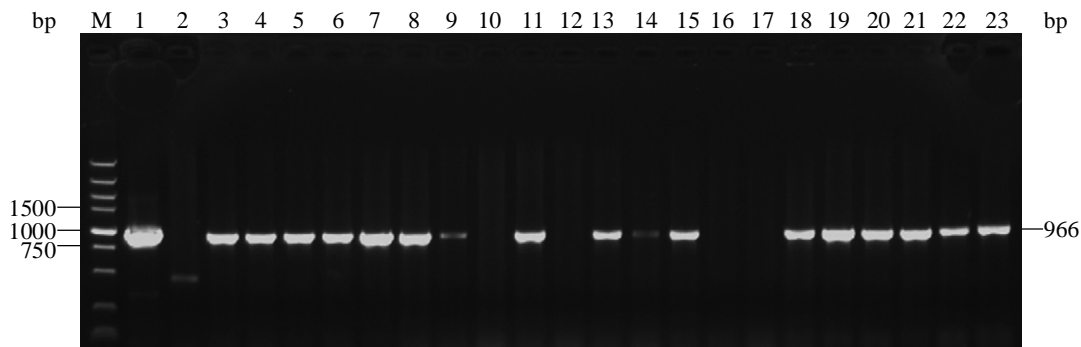


图4 *hptII* 基因特异引物PCR检测转基因植株

Figure 4 Identification of the transgenic plants by PCR with the specific primers for *hptII* gene

M: DL5000 DNA 分子量标准; 1: pH7WG2 质粒(阳性对照); 2: 野生型植株(阴性对照); 3~9, 11, 13~15, 18~23: 转基因阳性植株; 10, 12, 16~17: 转基因阴性植株

M: DL5000 DNA marker; 1: pH7WG2 plasmid (positive control); 2: Wild-type plant(negative control); 3~9, 11, 13~15, 18~23: The positive transgenic lines; 10, 12, 16~17: The negative transgenic lines

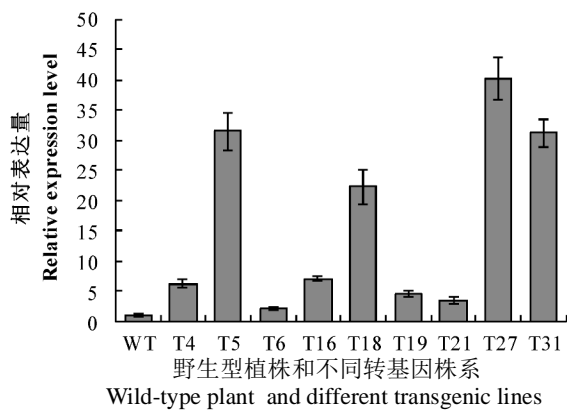


图5 qRT-PCR 分析超表达转基因植株中 *OsDSR4* 基因的表达水平

Figure 5 *OsDSR4* expression level in the *OsDSR4*-overexpressing transgenic lines as determined by qRT-PCR

WT: 野生型株系; Tn: 转基因不同株系; *Actin* 为内参基因, n=3  
 WT: Wild-type plant; Tn: *OsDSR4*-overexpressing transgenic lines; Reference gene: *Actin*, n=3

胁迫的抑制表达(Huang et al., 2008b; Song et al., 2009; Tao et al., 2011); Huang 等(2008a)的报道却表明 *SRZ1* 基因的表达受多种非生物胁迫的抑制, 与该实验结果相似, 本研究结果也表明 *OsDSR4* 基因的表达明显受干旱、高盐和低温等多个胁迫的抑制(图2A~C)。植物激素 ABA 在植物应对干旱和高盐等非生物胁迫适应过程中起着非常重要的作用(Cutler et al., 2010), 为了明确 *OsDSR4* 基因是否参与 ABA 信号途径, 本研究初步分析了 *OsDSR4* 在 ABA 胁迫下的表达变化, 实验结果表明 *OsDSR4* 基因受 ABA 的诱导表达(图2D)。为了进一步说明

*OsDSR4* 在非生物胁迫和 ABA 处理下的表达变化, 本实验分析了该基因启动子上的顺式调控元件, 发现该基因启动子区内存在一个 ABA 响应元件 ABRE 和多个与非生物胁迫相关的元件, 如 MYB 和 MYC 结合位点。这个分析结合逆境表达谱实验结果, 表明 *OsDSR4* 基因参与了水稻对干旱、高盐、低温和 ABA 的响应。

基因的组织表达谱常常可以暗示该基因在相应表达部位的生物学功能(Ray et al., 2007)。本研究通过 qRT-PCR 技术分析了 *OsDSR4* 基因在水稻扬花期不同组织中的表达模式, 结果表明 *OsDSR4* 基因在各种组织中均有表达, 其中茎节间和叶片中的表达量明显高于其他组织(图1)。然而 RiceXPro 数据库中的芯片数据却表明, 该基因主要在花序中表达, 其原因可能是两种不同方法分析组织表达谱时的组织取材时间和部位不一致造成的。为了更加详细地说明 *OsDSR4* 基因的组织表达模式, 还需要通过获得启动子融合报告基因(*GFP* 或 *GUS*)的转基因植株进一步研究。

重叠延伸 PCR 技术在基因的人工合成、定点突变、融合基因构建、长片段基因合成、以及基因敲除等方面已表现出广泛而独特的应用价值(徐芳等, 2006)。通常情况下克隆基因采取 RT-PCR 策略, 而对于长片段和表达丰度低的基因可采取重叠延伸 PCR 技术进行克隆, 胡亚平等(2009)的实验证实了这种方法的可行性。 *OsDSR4* 基因为低丰度表达基因, 因此, 本研究通过重叠延伸 PCR 技术成功克隆到了该基因的完整 ORF 序列。基因在宿主植

物中的超量表达是研究基因功能的常用方法之一,利用这一反向遗传学策略本研究获得了 *OsDSR4* 超表达转基因水稻(图3),通过分子鉴定证明 *OsDSR4* 已在部分转基因植株中实现了超量表达(图5)。

本研究结果初步表明, *OsDSR4* 基因主要在水稻的茎节间和叶片中表达,干旱、高盐和低温等非生物胁迫明显抑制了 *OsDSR4* 的表达,而 ABA 则显著诱导了它的表达;通过重叠延伸 PCR 方法成功克隆了 *OsDSR4*, 并获得了超表达转基因植株, qRT-PCR 分析显示该基因已在部分转基因植株中实现了超量表达。这些结果为进一步阐明 *OsDSR4* 基因在水稻逆境响应中的作用提供了基础资料。

### 3 材料与方法

#### 3.1 植物材料与处理

本研究以粳稻中花 11(*Oryza sativa* L. ssp. japonica, ZH11)为实验材料,将水稻幼苗水培至四叶期,选择长势一致的幼苗分 3 部分进行处理:一部分幼苗提取叶片基因组 DNA 和总 RNA,用于 *OsDSR4* 的克隆;一部分幼苗进行干旱、高盐、低温和 ABA 胁迫处理,用于逆境表达分析。胁迫处理参照 Xiang 等(2007)的方法进行:干旱处理是将正常生长的幼苗暴露在空气中进行断水处理,高盐处理是将幼苗根部浸泡在 150 mmol/L NaCl 溶液中处理,低温处理是将幼苗置于 4℃ 生长箱,12 h 光照/12 h 黑暗处理,3 种非生物胁迫均在处理 0、1、3、6、12 和 24 h 后分别取样。ABA 处理是用 100 μmol/L ABA 溶液喷洒叶片,在处理 0、0.5、1、3、6、12 和 24

h 后取样;剩余一部分幼苗移栽至盆土中并置于室外自然条件下生长。待水稻生长至扬花期,分别剪取根、茎节间、茎节、叶片、花序、叶鞘、叶枕和叶舌等不同组织,用于组织表达模式分析。所有采集样品立即用液氮速冻后置于 -80℃ 保存备用。

#### 3.2 基因组 DNA 和总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采用 CTAB 法提取水稻叶片基因组 DNA;采用 Trizol 试剂(Invitrogen, 上海)提取水稻不同组织总 RNA, RNA 样品经过 Dnase I (RNase free) (TaKaRa, 大连)消化去除基因组 DNA 污染后,按照逆转录试剂盒说明书利用 M-MLV 反转录酶 (TaKaRa, 大连)合成 cDNA 第一链。

#### 3.3 *OsDSR4* 克隆、超表达载体构建及遗传转化

根据水稻 *OsDSR4* 基因的编码序列,设计引物分段扩增 *OsDSR4* 基因,引物序列见表 1。以基因组 DNA 为模板,分别利用高保真 *pfu* DNA 聚合酶、各外显子引物对扩增各外显子,并回收纯化各外显子片段。根据重叠延伸 PCR 原理(Horton et al., 1990)以第 2 和 3 外显子片段的混合物(按一定的摩尔比混合两 DNA 片段)为模板,利用引物 OsDSR4-2-S 和 OsDSR4-3-A 拼接 *OsDSR4* 基因的第 2 和 3 外显子;以同样的方法利用 OsDSR4-1-S 和 OsDSR4-3-A 拼接前 3 个外显子片段,利用 OsDSR4-4-S 和 OsDSR4-5-A 拼接后两个外显子片段,最后用引物 OsDSR4-1-S 和 OsDSR4-5-A 拼接 *OsDSR4* 基因的完整 ORF。PCR 反应体系为: 10×PCR buffer 2 μL, dNTP 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA

表 1 重叠延伸 PCR 扩增 *OsDSR4* 基因所用引物

Table 1 Primers used for the *OsDSR4* gene amplification by overlap extension PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	用途 Purpose
OsDSR4-1-S	CACCATGGAGGCGACGGTGGAAG	第 1 外显子扩增
OsDSR4-1-A	<u>ATCCATCACATCTTTGAGGCGAAGTGGCTG</u>	The first exon amplification
OsDSR4-2-S	<u>TCGCCTCAAAGATGTGATGGATAGGCTCAC</u>	第 2 外显子扩增
OsDSR4-2-A	<u>TCTTGTAGTTCCTCTTGCAAGACCATGAGA</u>	The second exon amplification
OsDSR4-3-S	<u>TCTTGCAAGAGGAAGTACAAGAACGGGTA</u>	第 3 外显子扩增
OsDSR4-3-A	<u>TGGGAACCGATCGGAAGAAGACGCCAGGGAA</u>	The third exon amplification
OsDSR4-4-S	<u>CTGTCTTCCGATCGGTTCCACACCTTCG</u>	第 4 外显子扩增
OsDSR4-4-A	<u>GCCTCGAACTCCTCTCCTCGTTGTACGAGT</u>	The fourth exon amplification
OsDSR4-5-S	<u>AACGAGGAGAGGAGTTTCGAGGCTTGGTGTC</u>	第 5 外显子扩增
OsDSR4-5-A	<u>TTACTTGTGCTGCTTCTTCCTG</u>	The fifth exon amplification

下划线部分为相连引物间的重叠区域

The parts of primer underlined indicate the overlapping regions of adjacent primers



模板 2  $\mu\text{L}$ , *pfu* DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  11.8  $\mu\text{L}$ ; 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$  5 min, 95 $^\circ\text{C}$  30 s, 退火温度 30 s, 72 $^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环。退火温度因扩增不同片段而异, 其中, 第 1 外显子片段为 60 $^\circ\text{C}$ , 第 2、3、4 和 5 外显子片段均为 56 $^\circ\text{C}$ , (2+3) 片段、(4+5) 片段、(1+2+3) 片段和 (1+2+3+4+5) 片段分别为 56、56、58 和 62 $^\circ\text{C}$ 。

将拼接获得的最终 PCR 产物回收纯化, 定向克隆到入门载体 pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO<sup>®</sup> 中进行测序, 测序验证正确后利用 LR 反应将目的基因重组进植物表达载体 pH7WG2, 经 PCR 和酶切鉴定后, 将鉴定正确的超表达 *OsDSR4* 重组质粒通过根癌农杆菌介导的方法(Hiei et al., 1994)转化进水稻中花 11, 获得 *OsDSR4* 超表达转基因水稻。

### 3.4 基因表达分析及转基因植株分子鉴定

利用 *hpt* II 基因特异引物:

hptII-S: 5'-TCTACACAGCCATCGGTCCA-3';

hptII-A: 5'-GAAAAAGCCTGAACTCACCGC-3'。

对转基因植株进行 PCR 检测, 野生型植株作为对照。PCR 反应体系为: 2 $\times$ PCR *TaqMix* 5  $\mu\text{L}$ , 引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  3  $\mu\text{L}$ ; 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$  5 min; 95 $^\circ\text{C}$  30 s, 60 $^\circ\text{C}$  30 s, 72 $^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环。

利用 qRT-PCR 技术检测目的基因在水稻不同组织和胁迫条件下及转基因植株中的表达变化。根据 *OsDSR4* 的全长 ORF 序列设计特异性引物: *OsDSR4*-qRT-S: 5'-TAGGCTCACGCTGCTTAGGG-3'; *OsDSR4*-qRT-A: 5'-GGAAGAACAGCCAGGGAAGAT-3'。以水稻 *Actin* 基因(X15865)作为内参基因, 其引物为: *Actin*-qRT-S: 5'-TGTATGCCAGTGGTCGTACCA-3'; *Actin*-qRT-A: 5'-CCAGCAAGGTCGAGACGAA-3'。荧光定量 PCR 的反应体系为: SYBR<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> II 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  6.8  $\mu\text{L}$ ; 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$  30 s, 95 $^\circ\text{C}$  5 s, 60 $^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环, 在每个循环 72 $^\circ\text{C}$  延伸最后 5 s 进行荧光采集。定量数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法(Livak et al., 2001)对 qPCR 实验数据进行目的基因相对表达量分析。每个样品 3 个重复, 每个实验重复 3 次。

### 3.5 生物信息学分析

从 RGAP(<http://rice.plantbiology.msu.edu>) 和 GRAMENE 数据库(<http://www.gramene.org/>)中下载 *OsDSR4* 基因及其推测的氨基酸序列; 通过 PLACE

数据库(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)分析 *OsDSR4* 基因启动子上的顺式调控元件; 利用 NCBI 中的 CDD 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)对 *OsDSR4* 基因编码的蛋白进行保守区预测; 通过 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)确认 DUF966 家族; 应用 TMHMM([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM2.0/))和 WoLF PSORT(<http://wolfpsort.org>)在线工具分别预测 *OsDSR4* 蛋白跨膜区和核定位情况; 使用 RiceXPro 数据库(<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>)中的芯片数据进行组织表达谱分析, 利用 RiceGE(<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>)和 Genevestigator 数据库(<https://www.genevestigator.ethz.ch>)中的芯片数据进行逆境表达谱分析。

### 参考文献

- Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R and Abrams S R, 2010. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Reviews Plant Biology*, 61: 651~679
- Gao Y S, Badejo A A, Sawa Y and Ishikawa T, 2012. Analysis of two L-Galactono-1,4-Lactone-responsive genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell & Physiology*, 53(3): 592~601
- Hiei Y, Ohta S, Komari T and Kumashiro T, 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2): 271~282
- Horton R M, Cai Z L, Ho S N and Pease L R, 1990. Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 8(5): 528~535
- Hu H H, Dai M Q, Yao J L, Xiao B Z, Li X H, Zhang Q F and Xiong L Z, 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of National Academy Sciences of the USA*, 103(35): 12987~12992
- Hu Y P, Xia Y P, Wu G, Wu Y H, Xiao L, Li J and Lu C M, 2009. An overlap extension PCR method used in isolation of long cDNAs of acetyl-CoA carboxylase from *Arabidopsis*. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 31(4): 407~412(胡亚平, 夏玉平, 吴刚, 武玉花, 肖玲, 李均, 卢长明, 2009. 重叠延伸 PCR 克隆拟南芥 *ACCase* 基因和植物表达载体构建. *中国油料作物学报*, 31(4): 407~412)
- Huang J, Wang M M, Jiang Y, Wang Q H, Huang X and

- Zhang H S, 2008a. Stress repressive expression of rice *SRZ1* and characterization of plant *SRZ* gene family. *Plant Science*, 174: 227~235
- Huang J, Wang M M, Jiang Y, Bao Y M, Huang X, Sun H, Xu D Q, Lan H X and Zhang H S, 2008b. Expression analysis of rice A20/AN1- type zinc finger genes and characterization of *ZFP177* that contributes to temperature stress tolerance. *Gene*, 420: 135~144
- Huang X Y, Chao D Y, Gao J P, Zhu M Z, Shi M and Lin H X, 2009. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes & Developments*, 23: 1805~1817
- Jan A, Maruyama K, Todaka D, Kidokoro S, Abo M, Yoshimura E, Shinozaki K, Nakashima K and Yamaguchi- Shinozaki K, 2013. *OsTZF1*, a CCCH-Tandem Zinc Finger Protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes. *Plant Physiology* 161: 1202~1216
- Jensen J K, Kim H, Cocuron J C, Orlor R, Ralph J and Wilkerson C G, 2011. The DUF579 domain containing proteins IRX15 and IRX15-L affect xylan synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 66: 387~400
- Kim S J, Ryu M Y and Kim W T, 2012. Suppression of *Arabidopsis* RING- DUF1117 E3 ubiquitin ligases, *AtRDUF1* and *AtRDUF2*, reduces tolerance to ABA-mediated drought stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420: 141~147
- Kim S T, Kang Y H, Wang Y M, Wu J N, Park Z Y, Rakwal R, Agrawal G K, Lee S Y and Kang K Y, 2009. Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension- cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics*, 9: 1302~1313
- Li X J, Sun L J, Tan L B, Liu F X, Zhu Z F, Fu Y C, Sun X Y, Sun X W, Xie D X and Sun C Q, 2012. *TH1*, a DUF640 domain-like gene controls lemma and palea development in rice. *Plant Molecular Biology*, 78: 351~359
- Livak K J and Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402~408
- Punta M, Coghill P C, Eberhardt R Y, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N Z, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer E L L, Eddy S R, Bateman A and Finn R D, 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40: D290~D301
- Qin D D, Xie S C, Liu G, Ni Z F, Yao Y Y, Sun Q X and Peng H R, 2013. Isolation and functional characterization of heat- stress- responsive gene *TaWTF1* from wheat. *Chinese Bulletin of Botany*, 48(1): 34~41(秦丹丹, 谢颂朝, 刘刚, 倪中福, 姚颖垠, 孙其信, 彭惠茹, 2013. 小麦中编码未知蛋白的热胁迫响应基因 *TaWTF1* 的克隆和功能分析. *植物学报*, 48(1): 34~41)
- Ray S, Agarwal P, Arora R, Kapoor S and Tyagi A K, 2007. Expression analysis of calcium- dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Molecular Genetics and Genomics*, 278(5): 493~505
- Seo J S, Joo J, Kim M J, Kim Y K, Nahm B H, Song S I, Cheong J J, Lee J S, Kim J K and Choi Y D, 2011. OsBHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *The Plant Journal*, 65(6): 907~921
- Song Y L, Wang L and Xiong L Z, 2009. Comprehensive expression profiling analysis of *OsIAA* gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments. *Planta*, 229(3): 577~591
- Tao Z, Kou Y J, Liu H B, Li X H, Xiao J H and Wang S P, 2011. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 62 (14): 4863~4874
- Tirajoh A, 2005. Isolation and characterization of novel salt responsive- genes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) roots. Thesis for Ph.D., Simon Fraser University, supervisor: Plant A L, pp.1~290
- Urbanowicz B R, Peña M J, Ratnaparkhe S, Avci U, Backe J, Steet H F, Foston M, Li H J, O' Neill M A, Ragauskas A J, Darvill A G, Wyman Charles, Gilbert H J and York W S, 2012. 4- O- methylation of glucuronic acid in *Arabidopsis* glucuronoxylan is catalyzed by a domain of unknown function family 579 protein. *Proceedings of National Academy Sciences of the USA*, 109(35): 14253~14258
- Xiang Y, Huang Y M and Xiong L Z, 2007. Characterization of stress- responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*, 144(3): 1416~1428
- Xu F, Yao Q H, Xiong A S, Peng R H, Hou X L and Cao B, 2006. SOE PCR and its application in genetic engineering. *Molecular Plant Breeding*, 4(5): 747~750 (徐芳, 姚泉洪, 熊爱生, 彭日荷, 侯喜林, 曹兵, 2006. 重叠延伸PCR技术及其在基因工程上的应用. *分子植物育种*, 4(5): 747~750)