

水稻组蛋白 H2B.7 基因的分离和表达模式研究

聂培培, 李晓瑜, 刘耀光, 张群宇

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:选取水稻组蛋白 H2B 的 H2B.7 基因进行了表达模式分析,发现其在水稻根、茎、叶和穗等组织中为组成型表达,但在激素和胁迫处理时表达模式发生变化,如在 2,4-D、 α -萘乙酸 (NAA)、乙烯以及热激处理时表达水平上调,在激动素 (KT)和多效唑处理时表达水平下调,说明水稻组蛋白 H2B.7 基因的表达在植物内外环境变化时也会相应发生改变。

关键词:水稻; 组蛋白; H2B.7; 基因表达

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)02-0119-03

Molecular Cloning and Expression Analysis of A Gene Encoding Rice Histone Protein H2B.7

NIE Peipei LIXiao-yu LIU Yao-guang ZHANG Qun-yu

(College of Life Science South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A gene OsH2B.7 encoding rice histone protein H2B.7 was isolated and its expression profiles analyzed. The results showed that gene OsH2B.7 was constitutively expressed in roots, stems, leaves and panicles while its expression was affected by some phytohormones and stresses. The expression was up-regulated by 2,4-D, NAA, ethylene and heat while down-regulated by KT and Paclobutrazol. These indicate that the expression of gene OsH2B.7 is responsible to the internal and external signals.

Key words: rice; histone; H2B.7; gene expression

核小体由 DNA 和组蛋白 (Histone) 构成, 是染色质 (染色体) 的基本结构单位。核小体由核心颗粒 (Core particle) 和连接区 DNA (linker DNA) 2 部分组成, 包括组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各 2 分子构成八聚体, 缠绕其上长度为 146 bp 的 DNA 链; 以及相邻核心颗粒间约 60 bp 的连接 DNA 和位于连接 DNA 上的组蛋白 H1。染色体的多级折叠过程中, 需要 DNA 同组蛋白 (H3、H4、H2A、H2B 和 H1) 结合在一起。组蛋白在进化中是保守的, 但它们并不是通常认为的静态结构, 组蛋白在翻译后的修饰中会发生改变, 如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、ADP 核糖基化、SUMO (Small ubiquitin-related modifier) 修饰、生物素化、去精氨酸化和脯氨酸同分异构化^[1], 从而提供一种识别的标志, 为其他蛋白与 DNA 的结合产生协同或拮抗效应。因此它是一种动态转录调控成分, 称为组蛋白密码 (Histone code)。通常认为组蛋白是组

成型表达。在真核生物中, 组蛋白由多个同源基因编码, 如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 组蛋白 H2A 有 HTA.3、HTA.13、H2A.Z 等 13 个同源基因, 其中 H2A.Z 的染色质组成水平变化与拟南芥冷处理相关。组蛋白同源基因的表达模式也不完全相同, 如爪蟾 *Xenopus laevis* H2A.Z 基因在不同的发育阶段表达水平也发生变化^[2]。对水稻 H2B 基因进行的同源分析表明水稻内有 11 个同源基因, 目前对该家族表达模式和功能的研究鲜见报道。本文选择水稻 H2B 的一个同源基因 H2B.7 (NP_001042049.1; GI_115434582) 进行激素和非生物胁迫条件下的表达模式分析, 为开展水稻组蛋白 H2B 研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为水稻品种中花 11 (ZH11)。水稻种子

收稿日期: 2010-06-12

作者简介: 聂培培 (1988—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 张群宇 (1973—), 男, 副研究员, 博士, E-mail: zqy@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30740072, 30871331)

在 30℃ 萌发, 种植在 MS 液体培养基中, 在恒温 28℃、14 h 光照和 10 h 黑暗条件下培养 21 d 水稻幼苗置于 MS(对照)和各种激素溶液(含有各种激素的 MS)中处理 24 h(恒温 28℃、14 h 光照和 10 h 黑暗培养), 激素终浓度为: 激动素(KT)3.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞分裂素(6-BA)13.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 多效唑(Pac)1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, α -萘乙酸(NAA)2.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3-吲哚乙酸(IA)2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 脱落酸(ABA)100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 水杨酸(SA)1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙烯利(Ethrel)0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 赤霉素(GA₃)50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 非生物胁迫处理条件为: 42℃ 热激处理 2 h; 4℃ 冷胁迫处理 12 h; 28℃ 培养箱暗培养 24 h; w 为 23% 的 PEG6000 溶液干旱胁迫处理 12 h(28℃)^[3]; 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 盐胁迫处理 12 h(28℃)^[4]. 处理样品和对照样品取叶片放入液氮中速冻保存.

1.2 RNA 提取和 RT-PCR 分析

RNA 提取参照 Invitrogen 公司的 RNA 提取试剂 TRIzol® 的使用说明进行. 取约 1 μg 总 RNA 作为模板进行反转录(方法参见 Invitrogen 反转录试剂盒说明书), 从 20 μL 的反转录体系中取 0.25~0.50 μL 进行半定量 RT-PCR 分析 OsH2B.7 基因表达水平变化(引物序列为: OsH2B.7F: 5'-ggcgcccaaggcg-gag-3'; OsH2B.7R: 5'-gcggaagtaacttggg-3'), 以水稻 Actin1 基因(Os03g0718100)作为基因表达水平内参(引物序列为: Actin5: 5'-ctagcagcatgaagatca-3'; Actin3: 5'-accacaggtagcaataggta-3').

1.3 亚细胞定位

以 RT-PCR 方法克隆 OsH2B.7 基因(引物序列为: OsH2B.7 sal: 5'-agcgtcgacatggcgccaaggcgag-OsH2B.7 nco: 5'-ccacatggagcggaagtaacttggg), 限制性内切酶 SalI 和 NcoI 双酶切克隆到 35S 启动子驱动的增强型绿色荧光蛋白(Fluorescent protein EGFP)的 5' 端, 构成融合表达载体^[5]. 基因枪法(PDS/1000; BioRad)转化洋葱上表皮细胞瞬时表达该融合蛋白, 轰击参数为: 真空 88 000 Pa; 轰击气压 1 100 p s i (1 p s i = 6 894.76 Pa); 轰击距离 9 cm; 1.0 mm 金粉颗粒. 轰击后 25℃ 暗培养 24 h 后, 用 DNA 特异染料 DAPI(4',6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride Invitrogen)染色后用倒置荧光显微镜(Ix70 Olympus)在 488 nm 波长激光下观察绿色荧光蛋白(GFP), UV 激光观察 DAPI 染色结果.

2 结果与分析

2.1 水稻组蛋白 H2B 进化树分析和 OsH2B.7 基因的克隆

根据拟南芥组蛋白 H2B 序列(NP_190184.1 G1

2407802)分析 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)水稻同源蛋白序列, 在水稻蛋白质数据库中共收录了 11 个 H2B 同源蛋白质(或变体)序列. 将水稻 H2B 与拟南芥 H2B 同源基因^[6]导入 MEGA3.1 软件, Neighbor-joining 方法归类^[7]进行分析, 结果(图 1)显示水稻 H2B 可以分为 3 个亚群: 第 1 亚群包括 OsH2B.1 和 OsH2B.11; 第 2 亚群包括 OsH2B.3、OsH2B.4、OsH2B.10、OsH2B.6、OsH2B.8、OsH2B.7、OsH2B.5 和 OsH2B.9; 第 3 亚群包括 OsH2B.2. 拟南芥 H2B 分为 2 个亚群: 第 1 亚群包括 ATHTB9、ATHTB4 和 ATHTB1; 第 2 亚群包括 ATHTB11 和 ATHTB2. 在同源关系上拟南芥的第 1 个亚群和水稻的 H2B 序列相似性较高, 但水稻 H2B 蛋白质序列间表现出更小的序列差异.

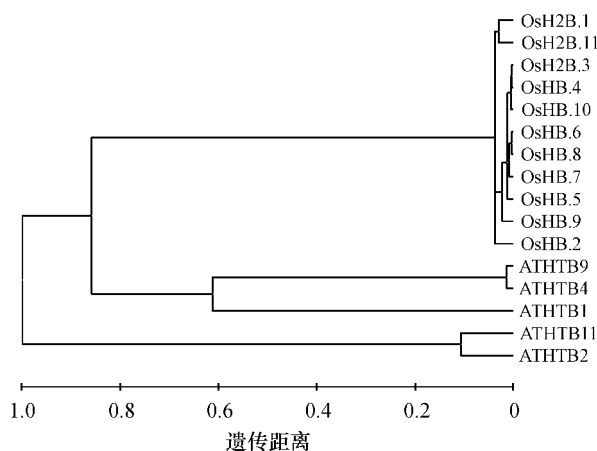


图 1 水稻与拟南芥 H2B 蛋白质序列进化树分析

Fig 1 Phylogenetic analysis of the H2B members in rice and Arabidopsis

根据 NCBI 数据库信息, 合成水稻 OsH2B.7 基因(NM_001048584.1)的 5' 和 3' 引物, 以水稻叶片反转录产物为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体后测序. 测序结果与 NCBI 数据库进行比较分析, 序列相似性为 100%, 表明该预测基因是真实存在的, 可以对该基因表达模式进行进一步分析.

2.2 OsH2B.7 基因表达模式分析

分别提取水稻根、茎、叶、幼穗和成熟穗的总 RNA, 进行半定量 RT-PCR 分析, 发现其在水稻根、茎、幼穗和成熟穗等组织表达水平相似, 在水稻叶片表达量较低(图 2).

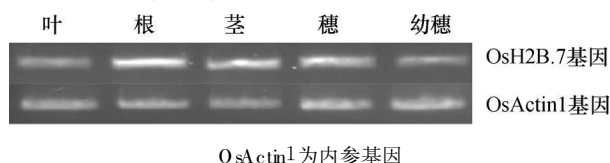


图 2 OsH2B.7 基因在水稻不同组织的表达的 RT-PCR

Fig 2 The expression pattern of gene OsH2B.7 in various tissues of rice detected by semiquantitative RT-PCR

O $\text{H}2\text{B}.7$ 基因在激素和非生物胁迫处理时表达模式发生较大的变化 (图 3、图 4), 如在 2, 4-D、NAA、乙烯以及热激处理时表达水平上调, 在 KT 和多效唑处理时表达水平下调, 其中表达水平变化较大的有 2, 4-D、NAA 和热激处理。

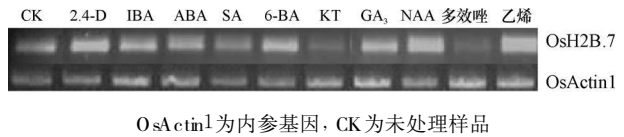


图 3 外源激素处理后的 O $\text{H}2\text{B}.7$ 基因在水稻苗叶片表达的 RT-PCR

Fig 3 The expression profiles of gene O $\text{H}2\text{B}.7$ in leaf of rice seedling detected by semiquantitative RT-PCR under different phytohormone treatments



图 4 非生物胁迫下 O $\text{H}2\text{B}.7$ 基因在水稻苗叶片表达的 RT-PCR

Fig 4 The expression profiles of gene O $\text{H}2\text{B}.7$ under different abiotic stresses detected by semiquantitative RT-PCR

2.3 O $\text{H}2\text{B}.7$ 亚细胞定位

为了确认 O $\text{H}2\text{B}.7$ 蛋白的亚细胞定位, 构建 P_{35S}: O $\text{H}2\text{B}.7$: EGFP 融合表达载体, 基因枪转化洋葱上表皮细胞瞬时表达该融合蛋白, 显微镜下观察在细胞核内 EGFP 荧光蛋白与 DAPI 共定位 (图 5), 说明 O $\text{H}2\text{B}.7$ 蛋白质定位于细胞核内。

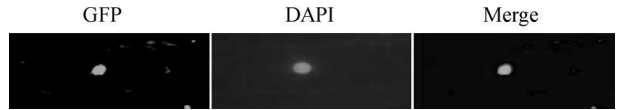


图 5 O $\text{H}2\text{B}.7$ 亚细胞定位在细胞核

Fig 5 O $\text{H}2\text{B}.7$ localizes in nuclei

3 讨论

随着对生物组蛋白的表观遗传学调控机理研究的深入, 多个研究小组发现生物体对核小体组蛋白的修饰不仅局限于共价修饰, 如乙酰化、甲基化等, 还表现在组蛋白在核小体中的组成比例上。拟南芥的 H2A.Z 是 H2A 的一种变体, 其占据核小体的组成比例直接影响了该区段 DNA 序列的转录活性, 例如 H2A.Z 在拟南芥热激蛋白基因 HSP70 启动子区域的组成比例与外界的温度相关, 起到类似温度计的作用, 当植物生长的环境温度较低时, 这种组蛋白会绑在 DNA 上, 使得一些基因无法发挥作用, 从而抑制植物生长; 而当温度升高时, 它就会松开 DNA, 相关基因就可以发挥作用, 指导植物生长^[8]。在爪蟾的

胚胎发育过程中, H2A.Z 的表达水平也在发生变化^[2]。因此真核生物中进化出多个不同的组蛋白变体, 可能与感受体内外环境变化信号有关。在拟南芥通过蛋白质组学方法鉴定了 5 种 H2B 变体: HTB1、HTB2、HTB4、HTB9 和 HTB11^[6], 但对其功能差异的研究鲜见报道。本研究中发现水稻 O $\text{H}2\text{B}.7$ 基因在水稻根、茎、幼穗和成熟穗等组织中表达水平相似, 在水稻叶片表达量稍低; 而在不同的外源激素和非生物胁迫下, 其表达水平发生了较大的变化, 表明 O $\text{H}2\text{B}.7$ 基因很可能处于生长素、细胞分裂素、赤霉素和乙烯等多种激素信号传导途径的交汇点, 控制根的生长与发育、茎的伸长、叶片的衰老、雌花的产生以及果实的成熟和脱落, 并与植株的耐热性相关, 该 H2B 变体有可能参与感受外界信号变化的表观遗传调控途径, 对该基因的进一步研究将拓展对水稻表观遗传学机理的研究。

参考文献:

[1] HASSA P O, HOTTIGER M O. An epigenetic code for DNA damage repair pathways [J]. *Biochem Cell Biol* 2005, 83(3): 270-85.

[2] IOUZALEN N, MOREAU J M, ÉCHALIM H2A.ZI a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A [J]. *Nucleic Acids Res* 1996, 24 (20): 3947-3952.

[3] GUO Zhen-fei, OU Wei-zhen, LU Shao-yun et al Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity [J]. *Plant Physiol Biochem* 2006, 44(11/12): 828-836.

[4] HE Xin-jian, CHEN Jian-quan, ZHANG Zhi-gang et al Identification of salt-stress responsive genes in rice (*Oryza sativa* L.) by cDNA array [J]. *Sci China C: Life Sci* 2002, 45(5): 477-484.

[5] CORMACK B P, VALDIVIA R H, FALKOW SF. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) [J]. *Gene* 1996, 173: 33-38.

[6] BERGMÜLLER E, GEHRIG P M, GRUISSEM W. Characterization of post-translational modifications of histone H2B-variants isolated from *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Proteome Res* 2007 6(9): 3655-3668.

[7] KUMAR S, TAMURA K, NEIM. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics* 2004, 5 (2): 150-163.

[8] VINOD K, PHILIP W. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis* [J]. *Cell* 2010, 140(1): 136-147.

【责任编辑 李晓卉】