

水稻 bHLH 基因家族成员表达模式分析

李晓星¹, 蒋海雄², 黄青云¹, 夏令¹, 张红心¹, 张大兵^{2*}, 陈亮^{1*}

(1 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

2 上海交通大学生命科学与技术学院, 上海 200240)

摘要: 为了研究碱性-螺旋-环-螺旋 (basic-helix-loop-helix, bHLH) 转录因子的生物学功能, 通过对开源数据库 TIGR 中水稻基因序列的预测, 我们找到了水稻中的部分 bHLH 转录因子家族成员. 用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 的方法在水稻根、茎、叶、花和种子中, 对这些成员的表达模式进行分析, 然后与已有的拟南芥的表达信息进行比较. 结果显示, 部分序列相似度较高的 bHLH 基因, 表达模式也较为相似, 说明其在功能上可能存在联系.

关键词: 水稻; 拟南芥; 碱性-螺旋-环-螺旋转录因子家族; 表达分析

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0073-05

碱性-螺旋-环-螺旋 (basic-helix-loop-helix, bHLH) 转录因子是一类含有众多成员的重要转录因子, 此命名是由于该类蛋白中含有 bHLH 结构域. 该结构域具有与 DNA 结合和与 bHLH 蛋白形成同源或异源二聚体的能力^[1]. bHLH 基因家族在动物和植物中都有十分重要的转录调控作用^[2~5], 但植物中对该家族的研究还比较少. 双子叶植物拟南芥的 bHLH 基因家族由 162 个成员组成^[5~7]. 水稻全基因组测序的完成^[8], 为深入研究水稻中的 bHLH 基因家族提供了可能.

1 材料与方法

1.1 材料

水稻材料: RNA 提取所用的水稻根、茎、叶、花材料来自小穗长 8~10 cm 粳稻日本晴 (*Oryza sativa japonica* cultivar Nipponbare) 植株 (种植于上海市农业科学院试验基地). 水稻材料采集后, 用液氮速冻, 保证 RNA 不被降解, 然后冻存于 -70 °C 超低温冰箱, 以备提取组织 RNA 时使用.

试剂: DNaseI (为 Promega 公司产品)、M-MuLV 反转录酶 (为 Fermentas 公司产品)、其他常用分子生物学试剂购自大连宝生物公司.

1.2 方法

水稻 bHLH 家族成员搜索: 通过网络数据库 TIGR

(The Institute for Genomic Research, 染色体组研究会, 网址为: <http://tigblast.tigr.org/tgi/>) 得到水稻基因注释信息^[9]中的 HMM (Hidden Markov Model 隐马尔科夫模型) 对获得的已由 TIGR 初步注释过的序列信息进行进一步验证, 找到了一部分预测的水稻 bHLH 基因家族成员.

PCR 引物设计: 由于 bHLH 家族成员间含有一些高度保守的序列, 我们通过 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)^[10]的方法, 避免 bHLH 结构域或其他一些高度同源序列被用于引物设计, 以确保每对引物特异扩增所需的序列. 设计扩增产物长约 200~400 bp. RNA 提取采用 Chomczynski 等所用的方法^[11]. 产物用 DNaseI 处理后用于以 oligodT (18) 为引物的反转录. PCR 反应条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 40 sec, 56~58 °C 40 sec, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min. 阳性对照为水稻 Actin 基因片段 (551 bp). 每个样品重复 3 次, 3 次结果相同且条带大小符合预期设计的大小, 则视为有效的结果, 并随机挑选部分得到的条带进行测序验证 (英骏公司, 上海).

水稻 bHLH 家族成员在拟南芥中的同源基因寻找: 用 BLAST 程序搜索 NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gene Bank 中的拟南芥序列信息, 以找到的水稻 bHLH 氨基酸序列作为查询序列 (Query), 使用默认的参数. 得到的结果根据 E 值判断同源程度, 做为预测同源基因的依据. 同源的拟南芥基因的表达信息来自 Zhang X 等人 2005 年的结果^[12].

2 结果

2.1 水稻 bHLH 基因的确定

通过搜索 TIGR 的水稻基因注释信息, 并进行

收稿日期: 2006-01-06

项目基金: 国家科技部国家重点基础研究发展项目 (2005CB120802),

福建省青年人才创新项目 (2005J004)资助

作者简介: 李晓星 (1980-), 男, 硕士研究生.

* 通讯作者: chenlg@xmu.edu.cn, zhangli@sjtu.edu.cn

SMART 预测后, 找到 29 个水稻中的 HHLH 基因 (表 1).

2 2 确定水稻 bHLH 基因在拟南芥中的同源基因

用水稻 HHLH 基因的氨基酸序列, 搜索到拟南芥中与其相似性较高的序列 16 条 (表 1, 表中拟南芥

HHLH 基因编号依据的是 Toledo-Ortiz 等的编号体系^[5]). 这些相对应的基因相似性都在 40% 以上. 例如基因 Os01g13460 编码的蛋白与拟南芥 HHLH 蛋白的 Myc7E 进行序列联配 (图 1), 这两条序列的相似性为 52%, 其中 bHLH 结构域的相似性达到 91%.

2 3 RT-PCR 检测水稻 HHLH 基因表达活性

表 1 水稻 HHLH 基因染色体位置、编号及相关信息

Tab 1 Genome loci, accession numbers and information of rice bHLH genes

TGR_CHR 位置 编号	NCBI 蛋白质 编号	同源的拟南芥 bHLH 蛋白	染色体 编号	染色体位置 (Mbp)	Gene Bank 序列号
Os01g06640	XP_493769.1		01	3.1	AP002521
Os01g13460	NP_913553.1	Myc7E	01	7.5	AP001539
Os01g38610	NP_918464.1		01	21.5	AP003296
Os01g68700	NP_914823.1	GBF1-like	01	39.6	AP003433
Os02g47660	XP_467373.1	A bHLH063	02	28.7	AP005323
Os02g49480	XP_467577.1		02	29.8	AP005284
Os03g27390	XP_506906.1		03	15.5	AC099323
Os03g43810	CAD32238.1		03	24.3	AC128646
Os03g46860	XP_469225.1		03	26.2	AC116369
Os03g51580	AAT77090.1	A bHLH018	03	29.2	AC135228
Os03g51910	AAO38474.1	A bHLH074	03	29.5	AC135956
Os03g55220	XP_469848.1		03	31.1	AC084282
Os04g23550	CAE04677.1	A bHLH35	04	13.2	AL662999
Os04g35000	CAD41012.2		04	20.8	AL606632
Os04g35010	CAD41011.2		04	20.8	AL731623
Os04g47080	AAC49219.1	EGL1	04	27.4	AL606682
Os04g52770	CAB55398.1		04	30.9	AL117264
Os06g09370	BAD35276.1	A bHLH082	06	4.7	AP003514
Os06g30090	BAD46515.1		06	17.1	AP005967
Os06g41060	BAD35560.1	A bHLH060	06	23.6	AP003626
Os07g05010	NP_911152.1		07	2.2	AP004010
Os07g35870	XP_478610.1	A bHLH115	07	21.4	AP005156
Os08g38210	XP_483085.1	A bHLH102	08	24.0	AP004620
Os08g39630	XP_483255.1	A bHLH130	08	24.9	AP005245
Os09g29830	BAD34345.1	A bHLH049	09	16.6	AP006169
Os09g29930	BAD34354.1	A bHLH102	09	16.7	AP006169
Os10g23050	AAP53429.1	A bHLH096	10	11.5	AC079935
Os10g40740	AAP54971.1		10	21.4	AC069300
Os12g41650	CAD32238.1	PF4	12	25.3	AL928780

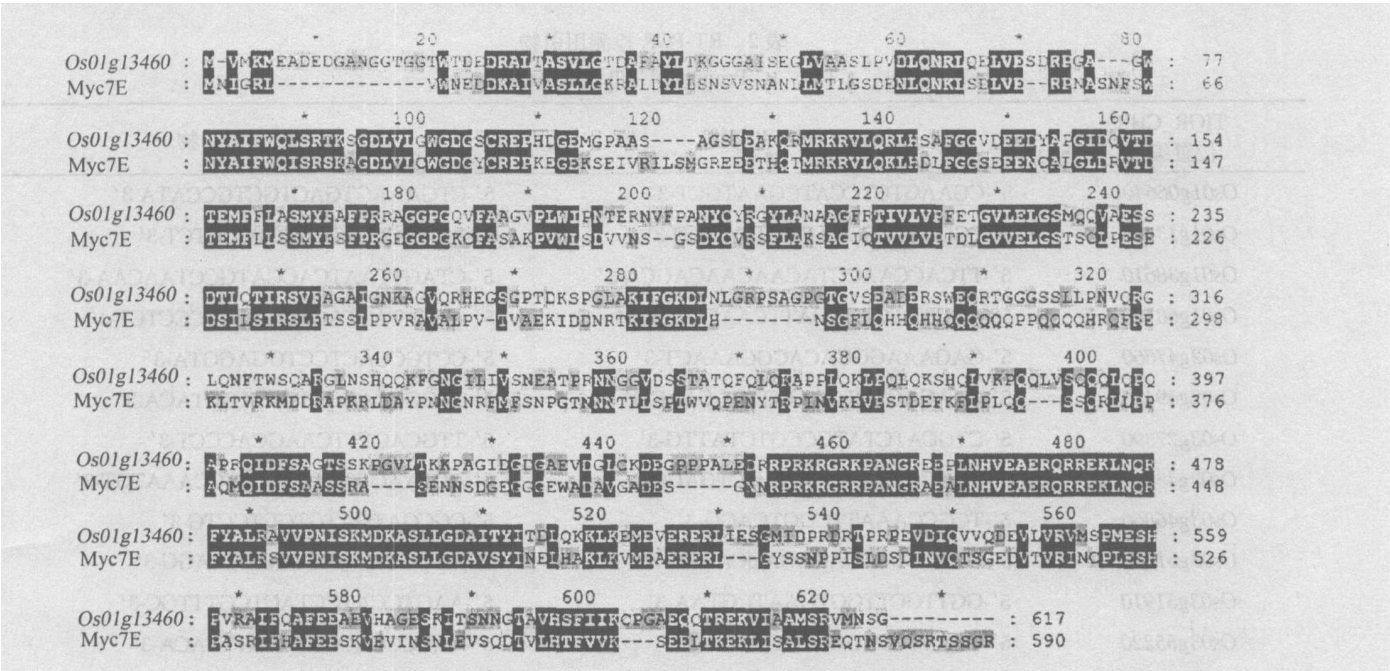


图 1 Os01g13460编码蛋白与 Myc7E 序列联配结果

Fig 1 Sequence alignment of Os01g13460 protein and Myc7E

根据 TGR 数据库公布的序列信息, 设计的 PCR 引物如表 2 所示. 通过 RT-PCR 的方法, 对 HHH 基因表达的 组织 特异性进行了分析 (图 2). 得到的产物条带中, 挑选了 Os04g2355Q Os09g2993Q Os03g5191Q Os01g6870Q Os06g4106Q Os07g0501Q Os10g4074Q Os03g27390 的条带进行测序, 结果与设计预期的序列相符.

RT-PCR 的结果显示, 水稻中 HHH 基因的表达分布在水稻的各个组织. 其中有多 个 HHH 基因在检测的 5 个组织 中都有表达, 如 Os01g0664Q Os03g5158Q Os07g0501Q 等. 也有部分 HHH 基因在特定组织表达, 如 Os06g3009Q 在茎和叶中表达, Os03g4686Q 只在花中表达, Os04g3500Q 只在种子中表达.

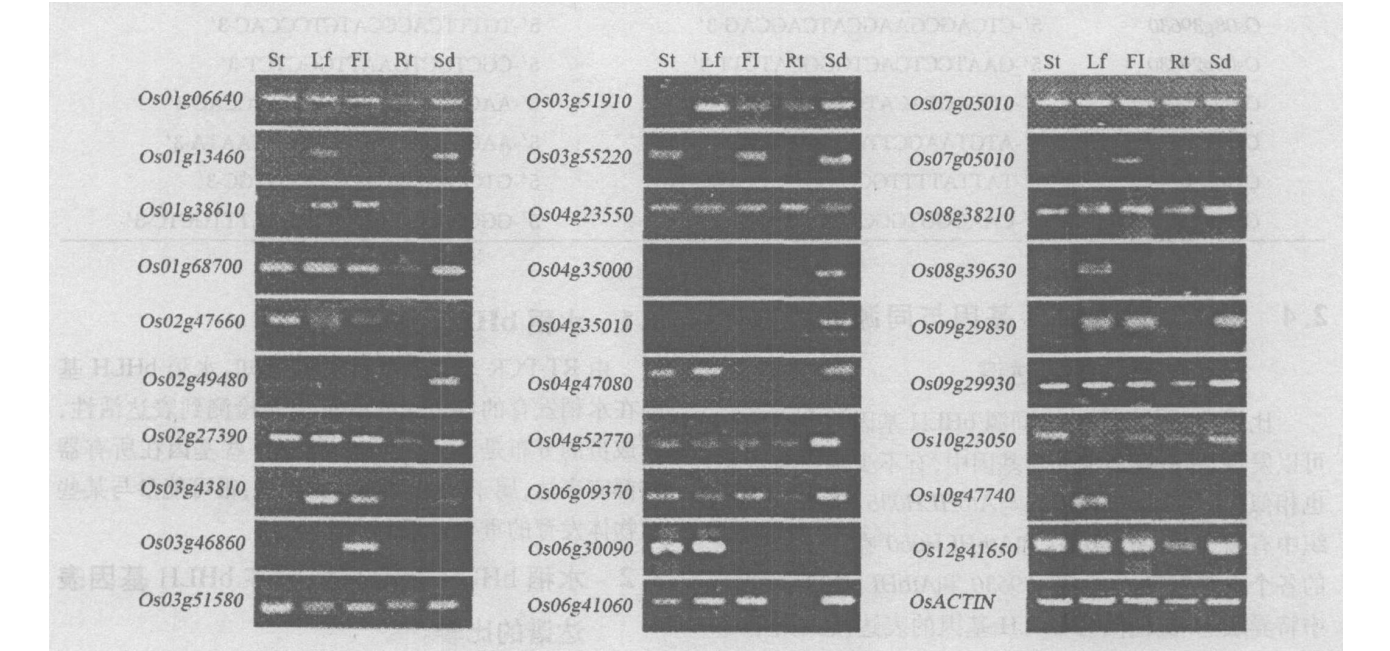


图 2 水稻 HHH 基因组织特异性表达谱

图片上方缩写表示 PCR 模板的组织来源, St (stem): 茎; Lf (leaf): 叶; Fl (flower): 花; Rt (root): 根; Sd (seed): 种子

Fig 2 Expression pattern of rice HHH genes

表 2 RT-PCR 检测用引物
Tab 2 Primers of RT-PCR detection

TIGR_CHR 位置编号	正 向 引 物	反 向 引 物
O s01g06640	5'-CGAAGTCTCCATCGAATGCT-3'	5'-CTGAAAGTGACTGCTGCCATA 3'
O s01g13460	5'-TGGATTCCCAA CA CTGAACG-3'	5'-ACGACCTTTCATCTGCTCT-3'
O s01g38610	5'-TTCA CCAACCTACAACAACAGCA-3'	5'-CTAGTTAATCA CCATGCCTAACAA-3'
O s01g68700	5'-AGCA CTCTGAGATTCAACCTA-3'	5'-ATGATATTACACGTCGTCCCTCT-3'
O s02g47660	5'-GAGAAAGGGACACGCAAAC-3'	5'-CCTGCCACTCCTGGAGGTA-3'
O s02g49480	5'-CAAGAGTCTGAACCAAGGCAAC-3'	5'-TTGGCCAGGTGATCTCTACA-3'
O s03g27390	5'-CTGCATCTATG CCGTCTATTG-3'	5'-TTGCACTTTC AAGCACCT-3'
O s03g43810	5'-TGGCAATAAAGGTAA CTGAGC-3'	5'-ACTAACTACTCTGTTCCAAATGT-3'
O s03g46860	5'-TCGCCAAATTCGGT CAGG-3'	5'-CG CGATGATGTGCTCCTG-3'
O s03g51580	5'-CAATCCACCA CAGAGCACA G-3'	5'-AGGG CAA CATTGCAGAAG-3'
O s03g51910	5'-GGTTGCTTGGTGAATCGTAA-3'	5'-AAGTCCATCCTACTCGTTTGG-3'
O s03g55220	5'-G CATTGCTGCGTGCTGAT-3'	5'-AACCCAC CCTCCATTACA-3'
O s04g23550	5'-GGATAGTGTC AAATGAAGCAG-3'	5'-CCTCGCAAGAAAACAACCA-3'
O s04g35000	5'-CCTGACGCCTCTGGACAAG-3'	5'-GCAAACCCACAATTACTGCA-3'
O s04g35010	5'-TAGCGTTCTTCGCTTTTCG-3'	5'-CGTTGTCACCA CCAATAATCTG-3'
O s04g47080	5'-AG CCCAACTCCGA CAA CG-3'	5'-TCCTCTTCCACGCCACAA-3'
O s04g52770	5'-TGATGACCACCTGA CGAGTTAC-3'	5'-AATTAGCCATGTTGATTTGC-3'
O s06g09370	5'-TG CCATAGTAATCCATCTCT-3'	5'-GCAGCGTTGAGTTATTATGT-3'
O s06g30090	5'-CGGGAAGGTGACATGCT-3'	5'-CGACCGAGGAGGAGAAGC-3'
O s06g41060	5'-CGGCTGGATGTCAGGAGA-3'	5'-TCGTAGTCAGG CATACA CCAA-3'
O s07g05010	5'-CAGAAACAAC TGTCCTAGAAGAA-3'	5'-TGCTGCCATTTCCATA G-3'
O s07g35870	5'-CAAGATTCA GTTTG CCGTGTA-3'	5'-GTGCTGGAACCCAAGTGATA-3'
O s08g38210	5'-TGGCG CTGAAGAA CA TCG-3'	5'-TGTCAGAGGGTGGGAGAAA G-3'
O s08g39630	5'-CTCAGCGAAG CATCAG CAG-3'	5'-TGTTTCA CCCATCTCCCAC-3'
O s09g29830	5'-GAATC CTCACTGGG CATCTT-3'	5'-CG CTG CTGAATTGG CTCT-3'
O s09g29930	5'-CCAGTACATCAGCGAACAAC-3'	5'-AAGAG CAGCTTCA CAATCCAC-3'
O s10g23050	5'-ATGTAAG CTGGGTCTGTGGA-3'	5'-AACCTCTCCCTGCTTCTTAATA-3'
O s10g40740	5'-TATTATTTTGCCTA CTA CCTCG-3'	5'-GTCCATCAGACCAAAGTGC-3'
O s12g41650	5'-CAAGGGTGGCACCAGTTGAT-3'	5'-GGCGGATGATAATA CAATTTGCTC-3'

2 4 比较水稻 bHLH 基因与同源的拟南芥 HLH 基因的表达谱

比较水稻和拟南芥中同源 bHLH 基因的表达信息可以发现, 序列相似的几对基因中, 有不少基因表达谱也相似, 比如: Os04g23550与 ArabHLH035都在 5 个组织中有表达; Os06g41060和 ArabHLH060在除了根之外的各个组织有表达; Os08g39630和 ArabHLH130都在叶中特异表达. 其他同源 bHLH 基因的表达模式则不尽相同.

3 讨 论

3 1 水稻 bHLH 基因表达谱

由 RT-PCR 表达分析的结果可知, 水稻 HLH 基因在水稻发育的各个组织器官都能检测到表达活性, 其成员的分布是十分广泛的. 其中一些基因在所有器官都有表达, 属于组成型表达的基因, 很可能参与某些植物体发育的重要过程.

3 2 水稻 bHLH 基因与拟南芥 bHLH 基因表达谱的比较

通过对水稻和拟南芥 bHLH 基因家族进行比较, 其中有多对可能的直系同源基因. 比较这些同源基因

的表达谱, 可以找到许多相似之处. 说明了这些基因不但在序列上相似程度较高, 表达特征也较为一致, 有很大的可能具有相似的功能. 为这些同源基因在早期有共同的祖先提供了佐证. 这也说明 bHLH 基因家族在单子叶植物和双子叶植物分化之前就已经存在. 其他一些成员, 虽然序列较为相近, 但是表达模式不同, 这说明水稻和拟南芥的 bHLH 基因, 在单子叶双子叶植物分化之后的进化过程中, 可能演化出了新的功能, 从而导致了表达部位的改变. 这一结果说明 bHLH 基因家族在进化的过程中既保持了其保守结构域的相对稳定, 又有所变化, 从而进化出不同物种中所特有的功能.

3.3 序列的信息学分析和表达谱研究的意义

通过序列分析和表达谱分析的方法, 我们可以初步研究某个基因的功能. 当某个基因的同源基因在相近的物种中已有较为深入的研究, 就可以对这个基因的功能进行初步的推测. 同源基因所在的物种越相近, 两个同源基因的序列相似性越高, 这样的推测就越可能接近真实情况.

参考文献:

[1] Muir C, McCaw P S, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding daughterless MyoD, and myc proteins[J]. Cell 1989, 56: 777– 783.

[2] Ledent V, Vervoort M. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis [J]. Genome Res, 2001, 11: 754– 770.

[3] Quail P H. Phytochrome-interacting factors [J]. Semin

Cell Dev Biol, 2000, 11: 457– 466.

[4] Sonnenfeld M J, Delvecchio C, Sun X. Analysis of the transcriptional activation domain of the Drosophila tango bHLH-PAS transcription factor[J]. Dev Genes Evol, 2005, 215(5): 221– 229.

[5] Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail P H. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family[J]. Plant Cell 2003, 15: 1749– 1770.

[6] Bailey P C, Martin C, Toledo-Ortiz G, et al. Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana[J]. Plant Cell 2003, 15: 2497– 2502.

[7] Heim M A, Jakoby M, Weber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity[J]. Mol Biol Evol, 2003, 20: 735– 747.

[8] IRGSP. The map-based sequence of the rice genome[J]. Nature, 2005, 436: 793– 800.

[9] Schultz J, Miethz F, Bork P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 5857– 5864.

[10] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool[J]. J Mol Biol, 1990, 215: 403– 410.

[11] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156– 159.

[12] Zhang X, Feng B, Zhang Q, et al. Genome-wide expression profiling and identification of gene activities during early flower development in Arabidopsis[J]. Plant Mol Biol, 2005, 58: 401– 419.

Expression Pattern Analysis of Rice bHLH Gene Family Members

LIXiao-xing¹, JIANGHai-xiong², HUANGQing-yun¹, XIALing¹,
ZHANGDa-bing^{2*}, CHENLiang^{1*}

(1 Key Lab of the Mini of Edu Cell Biol and Tumor Cell Eng, School of Life Sciences Xiamen Univ., Xiamen 361005, China; 2 School of Life Science and Biotechnology Shanghai Jiao Tong Univ., Shanghai 200240, China)

Abstract To study the biological function of the bHLH (basic-helix-loop-helix) transcription factors according to the prediction result from the rice gene sequences, we obtained some members of the bHLH transcription factor family. RT-PCR was performed to detect the expression pattern of these members in the root, stem, leaf, flower and seed of rice. Then the result was compared to the expression pattern of Arabidopsis. We found that genes with the similar sequences in both Arabidopsis and rice might have similar expression patterns, this indicates that they may have functional similarity.

Key words rice; Arabidopsis; basic-helix-loop-helix transcription factor family; expression analysis