水稻 10kDa 富硫醇溶蛋白基因家族中一个假基因拷贝的核苷酸序列分析

马建忠

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100083)

摘要 本研究以中花 10 号水稻为材料,利用 PCR 技术扩增并克隆 10kDa 富硫醇溶蛋白基因的成熟肽编码区。对扩增产物的核苷酸序列分析表明:本扩增产物长 380bp;与 Masumura 等人^[1]发表的序列相比,有 94.5%的同源性,与我们以前发表的中花 10 号水稻 10kDa 富硫醇溶蛋白基因的序列相比,有 99.5%的同源性。本扩增片段第 150 位与 151 位间的单碱基(T)插入导致了该片段编码区的移码突变,并在其后的第 162 至 164 位处形成了一琥珀终止子(TAG)。这表明水稻 10kDa 富硫醇蛋白基因家族中确实存在不正常的假基因拷贝。

关键词 水稻,10kDa 富硫醇溶蛋白,假基因,核苷酸序列

Sequence analysis of a pseudogene member in the 10kDa sulfur-rich prolamin gene family of the Chinese rice/Ma Jianzhong//CHINESE BIODIVERSITY. —1995, 3(2):88~90

In this paper, the 10kDa sulfur-rich prolamin gene was amplified by PCR, cloned and sequenced from Chinese rice. The sequence analysis showed that the amplified fragment was 380bp long, 94.5% homologous to the nucleic acid sequence reported by Masumura et al. ^[1] and 99.5% homologous to our previous results^[2]. The single base insertion between position 150 and 151 caused the reading frame mutation of the fragment and formed an amber codon at position between 162 to 164. These results showed that there would be a pseudogene member in the 10kDa sulfur-rich prolamin gene family.

Author's address Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081

Key words rice, 10kDa sulfur-rich prolamin, pseudogene, nucleic acid sequence

水稻 10kDa 醇溶蛋白是一个富含硫氨基酸残基的蛋白质,其成熟肽含 20%的 Met 及 10%的 Cys,因此,其编码基因可用于缺硫氨基酸作用或牧草的基因工程改良。此外,做为种子贮存蛋白,它在物种进化过程中所受到的选择压相对较小,因而能保存更多的突变型。水稻 10kDa 醇溶蛋白基因大小适中,便于进行 PCR 扩增和核苷酸序列分析,故也是在核苷酸水平上研究水稻起源和多态性的较好基因。

本研究以中花 10 号水稻(*Oryza sativa* var. *japonica* cv. Zhonghua 10)材料提取核 DNA。根据 Masumura 等人^[1]发表的 10kDa 醇溶蛋白基因的核苷酸序列,设计了 PCR 扩增反应的引物:5'-CAGTCGACACAATGGCAATCACCCTATGC(上游引物)和 5'-CTAGAATTCATGTAACCAACGTT(下游引物)。PCR 的变性、退火和延伸温度及时间分别为 93℃45 秒钟,55℃45 秒钟,72℃1 分钟。共进行了 30 个循环。扩增产物长约 400bp,克隆后进行了序列分析。结果(图

1)表明:我们所扩增的片段长 380bp;其核苷酸序列与 Masumura 等人^[1]发表的序列相比,有 94.5%的同源性,与我们以前发表的中花 10 号水稻的 10kDa 基因的序列相比,有 99.5%的同源性(Masumura 等人发表的序列与我们以前发表的序列相比,有 95.7%的同源性^[2])。突变位点中属于碱基转换的位点有 10 个,颠换的位点有 4 个,插入位点有 2 个共 4 个碱基(见封 3 图)。其中第 150 与 151 位间的单碱基(T)插入导致了该片段编码区移码突变,并在其后的第 164 位处形成了一个琥珀终止子(TAG)。通过挑选不同次 PCR 扩增产物的克隆进行序列分析表明,上述突变并非由 PCR 扩增反应所引入。因此,这一研究结果首次证实了水稻 10kDa 醇溶蛋白基因家族中确实存在不正常的假基因拷贝^[3]。

```

ATGGCAGCATACACCAGCAAGATCTTTGCCCTGTTGCCTTAATT 45
GCTCTTTCTGCAAGTGCCACTACTGCAATCACCCTATGCAGTAT 90
  上游引物=====▷=====
TTCCCACCAACATTAGCCATGGGCACCATGGATCCGTGTAGGCAG 135
-----G-----C-----A-----
TACATGATGCAAACGTTGGGCATGGGTAGCTCCACAGCCATGTTC 180
=====
                ↑
                T
ATGTCGCAGCCAATGGCGCTCCTGCAGCAGCAATGTTGCATGCAG 225
— A — A ————— T - C —————
CTACAAGGCATGATGCCTCAGTGCCACTGTGGCACCAGTTGCCAG 270
— G ————— A - A ——— A ——— A ———
ATGATGCAGAGCATGCAACAAGTTATTTGTGCTGGACTCGGGCAG 315
=====
CAGCAGATGATGAAGATGGCGATGCAGATGCCATACATGTGCAAC 360
-----C-----
                ↑
                ATG
ATGGCCCCTGTCAACTTCCAACCTCTCTTCCTGTGGTTGTTGTTGA 405
-----T-----
TCAAACGTTGGTTACATGTACTCTAGTAATAAGGTGTTGCATACT 450
—◁=====下游引物

```

图 1 日本水稻 Nipponbare(上行)和中国水稻中花 10 号(下行)的 10kDa 富硫醇溶蛋白基因序列的比较。双线代表引物部位,单线代表相同碱基

Fig. 1 A comparison on the nucleotide sequences of the 10kDa sulfur-rich prolamin gene between Nipponbare (upper row), a Japanese cultivar, and Zhonghua 10 (lower row), a Chinese cultivar. The double lines represent the primer position, and the single line represents the same bases.

Barbier 和 Ishihama^[3]曾比较了来自日本、印度、西亚、泰国、印度尼西亚和非洲等不同地区水稻 10kDa 富硫醇溶蛋白基因的核苷酸序列,日本水稻与非洲水稻的同源性最低,为 97.9%。但是,这一同源性却高于日本水稻与中国水稻(中花 10 号)之间的同源性(95.7%和 94.5%)^[2]。这一较

低的同源性反映了水稻不同品种间亲源关系的远近,或是 10kDa 醇溶蛋白基因家族不同成员间的差异,尚难确定。因此,中花 10 号水稻 10kDa 富硫醇溶蛋白基因的较高变异是否在中国其它水稻品种(尤其是野生稻)中存在,便成了一个值得深究的问题。我们相信,进一步的研究将有助于了解中国水稻的起源和演化过程。

参 考 文 献

- 1 T Masumura et al., cDNA cloning of an mRNA encoding a sulfur-rich 10kDa prolamin polypeptide in rice seeds. *Plant Molecular Biology*, 1989,12:123~130
- 2 徐晓明等,水稻 10kDa 醇溶蛋白的抗体制备及其克隆基因表达。见:《生物工程学报》编辑部(编),《生物工程论文集》,北京:化学工业出版社,1994,49~54
- 3 Barbier P, A Ishhama, Variation in the nucleotide sequence of a prolamin gene family in wild rice. *Plant Molecular Biology*, 1990,15:191~195

南沙综合科学考察十周年学术讨论会在广州举行

1994 年 12 月 12~14 日在广州举行了南沙综合科学考察十周年学术讨论会。南沙综合科学考察由中国科学院牵头,会同国家计委、国家科委、国家海洋局、农业部、国家测绘局、中国海洋石油总公司和国家教委等部委分工协作进行,从 1984 年 7 月直至 1994 年,在我国神圣领土南沙群岛及其邻近海区展开了 10 年的科学考察活动。此举为维护我国在南沙的主权与权益、国防建设、资源勘探开发、生态环境保护和开展热带海洋科学等方面作出了巨大贡献,填补了我国在南沙海域有关油气资源、生物与渔业资源和南沙环境工程地质等多方面的资料空白。

这次会议,聘请了中国科学院 14 位院士参加了会议,院士们高度评价了考察队在短短的十年里,对面积为 70 多万平方公里的南沙群岛进行了全面考察,所取得的丰硕成果是件非常了不起的事情。根据现在世界格局已发生的变化,1994 年 11 月 16 日生效的《联合国海洋公约》和海洋开发的战略转变,院士们呼吁在国家经济建设的“九五”期间需要将南沙的科考工作深入进行下去。南沙海域是研究热带低纬度地带生物多样性的理想场所;南沙海域其西南邻接马六甲海峡,沟通印度洋,生物区系为印度-西太平洋热带区系;南沙群岛的近岸海域,地貌条件复杂,为生物的栖息繁衍创造了许许多多的小生境,使这里生物种类的丰富度是印度-西太平洋区系中首屈一指的,是研究生物起源、演化的重要海域。

(王美林)