

一个水稻 *P450* 基因的 cDNA 扩增多态性分析

胡秀荣, 方良俊, 陈 晓, 朱志凯, 张 鑫, 詹聘芳

(广东海洋大学 农学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 在盐胁迫下, 经不同药物处理的水稻 R6 幼苗, 提取 RNA 并反转录为 cDNA 后, 对水稻 *P450* 基因 cDNA 序列扩增多态性进行分析。结果表明, 不同药物处理的水稻 R6 幼苗形态特征明显; 药物环孢素 (CsA) 处理的水稻细胞色素 *P450* 基因 CYP709 (*NM-001066006*) 缺失 430 bp 条带, 可能是 *NM-001066006* 基因与 *NM-001066009* 基因的外显子选择性剪接所致, 从而表现出功能基因扩增多态性。

关键词: 水稻; 药物; 细胞色素 *P450*; 功能基因扩增多态性

中图分类号: S511.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)01-0074-05

Amplified Polymorphism Analysis of a *P450* Gene in Rice cDNA

HU Xiu-rong, FANG Liang-jun, CHEN Xiao, ZHU Zhi-kai, ZHANG Xin, ZHAN Pin-fang

(Guangdong Ocean University, College of Agonomy, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: *P450* cDNA amplified polymorphism analysis in rice for the different drugs under salt stress. It was obvious morphological characteristics by different drug treatment conditions. Drug cyclosporine A (CsA) with rice cytochrome *P450* genes CYP709 (*NM-001066006*) loss 430 bp band may be *NM-001066006* gene and *NM-001066009* gene. Exon caused by alternative splicing, which showed functional genes amplified polymorphism.

Key words: Rice; Drugs; Cytochrome *P450*; Functional genes amplified polymorphism

细胞色素 *P450* 是广泛存在植物体中的一种多功能氧化酶, 通过基因重复和保守进化形成的一类庞大的超基因家族^[1]。*P450* 系统是机体内药物生物转化的主要酶系, 参与药物代谢的许多关键步骤。药物经过 *P450* 系统代谢排除毒性, 或代谢为具有生物活性的物质发挥药理作用^[2]。*P450* 可被底物诱导或抑制并加速或减缓底物和其他物质代谢^[3,4]。目前, 相关研究已证明细胞色素 *P450* 具有相当广谱的代谢外源物(药物、环境致癌物、化学毒物)的功能^[5,6], 并广泛存在着遗传多态性现象^[7]。王正超等^[8]的研究发现, 利福平与诱抗剂 HI 相互作用的机理可能是水稻 R6 植株内的细胞色素 *P450* 代谢诱抗剂 HI 产生耐盐信号物质, 利福平诱导细胞色素 *P450* 上调继而使这种耐盐信号物质增多, 或 *P450* 代谢诱抗剂 HI 耐盐信号物质, 利福平对这种信号物质加以修饰, 使其成为更有效的耐盐信号物质, 并认为通过诱导的方法或基因工程的手段改变 *P450* 的表达量, 可提高水稻的耐盐性。本研究主要针对 *P450* 能被药物诱导和抑制这种

特性, 在盐胁迫的条件下, 通过不同的药物处理, 观察 R6 幼苗的形态变化, 分析药物处理后 *P450* 基因表达的多态性。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻品种 R6, 能被诱抗剂 HI 诱导, 提高其耐盐性^[9]。R6 种子由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 水稻材料的处理 先将水稻种子浸种 24 h, 催芽至露白后, 再用不同的药物处理 24 h, 然后用 1% NaCl 培养。采用的药物主要是 *P450* 抑制剂: 12.5 g/L 红霉素 (Erythromycin, EM), 50 g/L 西米替丁 (Cimetiding, Cim); P-糖蛋白诱导剂和抑制剂: 0.04 mmol/L 利福平 (Rifampin, RFP), 0.20 mmol/L 环孢素 A (Cyclosporin A, CsA)。

1.2.2 水稻 RNA 的提取和反转录 cDNA 方法 不同药物处理水稻材料 10 d 后, 参考陈晓等^[10]方法,

收稿日期: 2008-11-15

基金项目: 广东省科技研究资助项目 (2006B20101013)

作者简介: 胡秀荣 (1982-), 女, 河北秦皇岛人, 硕士, 主要从事水稻耐盐遗传育种研究。

通讯作者: 方良俊 (1955-), 男, 广东湛江人, 教授, 硕士生导师, 主要从事水稻耐盐育种研究。

取样分别提取水稻根系和叶组织总 RNA，采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒一步提取。

1.2.3 引物设计 参考陈晓等^[10]报道的结果，设计水稻的 *P450* 基因(基因登录号:NM-001066006)的特异引物为: P₁: GGAGGATGCGGATGAGTTT; P₂: GGATCATGGCAATGACAGC, 扩增特异片段为 158 bp。组合引物为: P₃: AGAGCGTCACTTC; P₂:GGATCATG-GCAATGACAGC。

以上引物为上海生工合成。

1.2.4 RT-PCR 及 cDNA 序列扩增多态性方法 反转录酶购自 TOYOBO，按其试剂盒说明进行，将提取的 RNA 合成 cDNA。PCR 采用 25 μ L 体系: 200 mmol/L dNTP、上下游引物各 1 μ L、cDNA 4 μ L、*Taq* 酶 1 U 等。扩增条件: ①特异引物对 P₁P₂ 的扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 此过程为常规 RT-PCR 方法。②组合引物对 P₃P₂ 的扩增条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 min 后, 先进行 94 $^{\circ}$ C 40 s, 35 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 5 个循环, 然后 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺电泳检测^[11]，银染分析^[12]。

1.2.5 凝胶条带回收以及特异引物再检测 参照李拥军等^[13-15]的方法，将煮沸法与一步法结合回收条带，选用复合再扩增法进行回收条带的 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下不同药物处理的水稻 R6 形态特征

在盐胁迫下，不同药物处理的水稻 R6 植株形态表现明显不同(图 1)。清水对照的植株表现出根系发达、叶片伸展; 盐对照的植株明显抑制了根系生长、叶片短小。从植株形态上可以看到，CsA 能促进植株根系生长、叶片较为伸展，对盐胁迫有一定的缓解作用，但方良俊等^[16]用其根组织切片，观察到根细胞逐渐受到毒害而破坏根组织，可能是 CsA 抑制

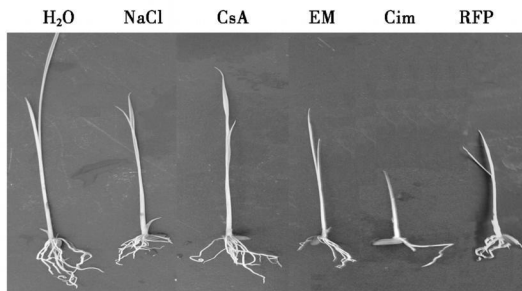
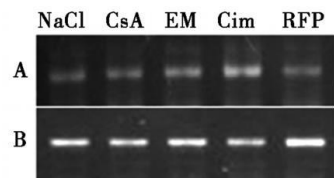


图 1 盐胁迫下不同药物处理水稻 R6 的植株形态特征

了 P-糖蛋白转运细胞毒物所致。而 RFP 是 P-糖蛋白诱导剂，在植株形态上明显地缓解盐胁迫对叶片伸展的抑制作用。P450 酶是代谢酶，参与 CsA、RFP 的代谢，Cim 非选择性抑制 P450 酶活性，因而显著地影响植株的正常生长。EM 也能抑制 P450 酶活性，但从植株生长形态不同可看出，EM 可能抑制 P450 酶的作用不同。这些药物直接作用于植株体内的代谢和转运过程，可能与不同基因的表达有关。

2.2 NM-001066006 特异片段的扩增结果

不同药物处理水稻所分别提取的 RNA，经反转录为 cDNA 后，用特异引物对 P₁P₂ 进行的 RT-PCR 扩增，结果见图 2。在叶组织(图 2-A)和根系(图 2-B)均得到一条 158 bp 特异带，这表明：一是 P₁P₂ 特异引物的 RT-PCR 扩增检测到不同药物处理水稻的 NM-001066006 基因均能表达; 二是 P₁P₂ 特异引物扩增片段具有特异性，由此确定采用 52 $^{\circ}$ C 的退火温度可达到特异扩增的要求。



A. 水稻叶组织材料; B. 水稻根系材料。

A. Rice leaves for the organization of materials; B. Rice root material.

图 2 水稻基因 NM-001066006 特异片段的扩增结果

Fig. 2 Amplified results of NM-001066006 gene in rice

2.3 功能基因 cDNA 序列扩增多态性检测

从不同药物处理的水稻根系中提取 RNA，经反转录为 cDNA 后，用组合引物 P₃P₂ 进行 PCR 扩增，结果见图 3。

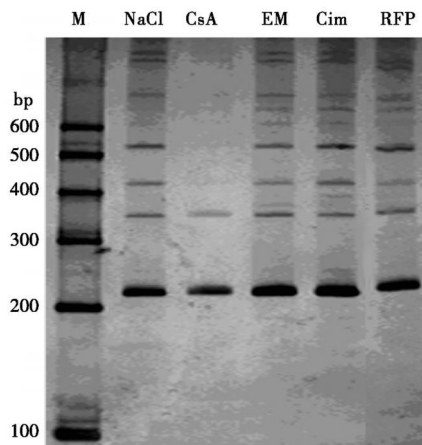


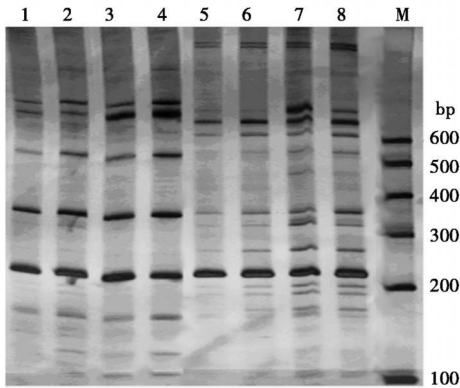
图 3 盐胁迫下不同药物处理水稻 R6 根系的 cDNA 序列扩增多态性

Fig. 3 The cDNA sequences amplified polymorphic of R6 root under different treatment in salt stress

从图 3 可看出，CsA 与其他药物处理的结果明显不同，NM-001066006 的 cDNA 扩增序列中仅在 220

Fig. 1 Plant morphological traits of R6 at different treatment in salt stress

bp 和 350 bp 处出现条带;而 430 bp 和 530 bp 条带缺失。为验证图 3 中 CsA 处理水稻出现不同带谱的结果,分别对 CsA 处理的水稻根系和叶片提取 RNA,经反转录成 cDNA 后,用组合引物 P₃P₂ 再重复 PCR,结果见图 4。

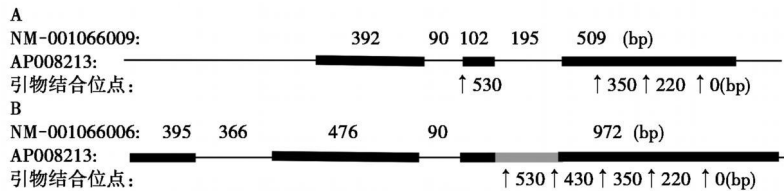


1~4. 水稻根系的重复;5~8. 水稻叶片的重复。
1—4. Repeat of rice roots; 5—8. Repeat of rice leaves.

图 4 CsA 处理、组合引物 P₂ 扩增的结果

Fig. 4 The amplified results under CsA treatment and primer P₂

从图 4 可见,根系的扩增条带较少、清晰、重复性好,与图 3 结果比较,除在 530 bp 处出现条带外,



A. AP008213 与 NM-001066009 同源性及组合引物 P₃ 在 NM-001066009 cDNA 序列中的结合位点;

B. AP008213 与 NM-001066006 同源性及组合引物 P₃ 在 NM-001066006 cDNA 序列中的结合位点。

A. The homology of AP008213 and NM-001066009 and cDNA sequence of binding sites in NM-001066009 of primer P₃

B. The homology of AP008213 and NM-001066006 and cDNA sequence of binding sites in NM-001066006 of primer P₃.

图 5 功能基因序列同源性分析

Fig. 5 Functional analysis of gene sequences

图 5 结果显示,对于 mRNA 序列, NM-001066006 及 NM-001066009 外显子和内含子有所不同, NM-001066006 的 972 bp 外显子中包含了 NM-001066009 的 509 bp 外显子、102 bp 外显子及 195 bp 内含子,可能是 NM-001066006 与 NM-001066009 选择性剪接的结果。组合引物的 P₃ 在距 P₂ 结合位点 430 bp 处有一结合位点(图 5-B),处于 195 bp 内含子中。巧合的是,约 530 bp 处的引物结合位点,对 NM-001066009 在 102 bp 外显子中,而对 NM-001066006 却在 195 bp 内含子中。故此推测, CsA 处理水稻后,应是 NM-001066009 基因的表达而不是 NM-001066006 基因的表达,其他药物处理水稻后,不可肯定 NM-001066009 基因能否表达,但可肯定 NM-001066006 基因的表达,由 2 个基因的选择性剪接而

430 bp 条带仍为缺失。叶组织与根系相比,所扩增的条带较多、表现较复杂,强带的重复性较好,但 430 bp 条带均没有出现。因而可认为,组合引物 P₃P₂ 检测到 NM-001066006 的 cDNA 序列具有多态性条带。

2.4 凝胶条带回收后的特异引物检测结果

将图 3, 4 的凝胶条带回收后,并用特异引物 P₁P₂ 作 PCR 扩增,结果扩增出 158 bp 特异条带,表明组合引物 P₃P₂ 所扩增的条带是在目标基因特异片段 5'侧翼,组合引物对中所用的特异引物 P₂ 起到了固定目标基因区域的作用。

2.5 基因同源性分析

用特异引物 P₁P₂ 作 PCR 所扩增的 158 bp 片段序列,在 GenBank 中进行 Blast 同源性分析。结果表明,该片段在水稻基因组 AP008213 上,属于第 7 染色体;而与 mRNA 序列 NM-001066006 及 NM-001066009 片段达 100%同源,因而 PCR 扩增具有特异性条带。再用单个(上游或下游)引物序列作 Blast 同源性分析,其结果也是特异性片段。

故此对水稻 DNA 序列 AP008213 与 mRNA 序列 NM-001066006 及 NM-001066009 作进一步的 Blast 同源性分析(图 5)。

检测到 cDNA 序列扩增多态性。

还未有充分的证据确定 NM-001066009 的基因功能,但对 NM-001066006 基因的同源性分析,认为属于 P450 基因(CYP709),已发现在长春花属植物中催化开联马钱子苷^[17]和生物碱的合成^[18]。氨基酸序列分析结果显示,2 个基因均具有 P450 基因的特征结构序列为 FSSG-PRSCIG,因而推测 NM-001066009 也属于 P450 基因。

3 讨论

在真核生物的基因中, mRNA 选择性剪接现象非常普遍,它导致一个基因多转录本的产生,被认为是高等生物增加蛋白质多样性的主要机制^[19]。因此,从同一个基因经过转录后的选择性剪接就可以

翻译成许多结构和功能不同的蛋白质^[20]。顾连峰等^[21]在水稻 *NBS-LRR* 基因选择性剪接的全基因组检测及分析的研究中发现, 内含子保留的选择性剪接是最常见的剪接形式, 内含子保留可能是因为 mRNA 不成熟^[22]。与这种假说相一致, 大约 20% *NBS-LRR* 基因在未剪接内含子内部遇到终止子, 例如 AK099775 在 C 末端有 3 个 WD40 重复序列, 但是 AK100136 并没有表现出 WD40 区域, 因为在第四号内含子中遇到了终止子^[21]。本研究检测到 430 bp 条带的缺失, 应该是转录过程中基因之间的可变剪接造成的内含子保留, 但其作用机制仍不清楚。

有研究表明^[23], 逆境可以诱导许多基因发生选择性剪接。*P450* 基因的表达能被许多诱抗剂、抑制剂所调节在医学和药理学上已经被广泛的研究^[24]。本研究对不同药物处理水稻幼苗进行 cDNA 的多态性检测, 结果发现盐胁迫下药物 CsA 处理的水稻 *P450* 基因 cDNA 出现了特异条带, 即缺失 430 bp 的条带。多数学者认为^[25-27] CsA 能与多药耐受基因 (MDR-gene) 编码的 P 糖蛋白竞争性结合, 抑制其“药泵”功能从而增加抗癌药物的细胞内积蓄。*P450* 的诱导和抑制是药物相互作用最常见的原因^[2], CsA 处理能够导致结合蛋白构型的改变^[25-27], 从而降低亲和力, 导致基因不能正常表达。本试验的研究结果也显示, 在逆境条件下 CsA 诱导水稻 NM-001066006 基因发生选择性剪接, 可见水稻 *P450* 基因对药物 CsA 有明显作用, 因而在水稻中利用 CsA 研究 *P450* 基因、MDR 基因与抗逆性的相互作用值得深入探讨。

目前对 mRNA 选择性剪接的研究方法不多, 在人类基因组发生选择性剪接变异的研究中证实 RT-PCR 检测比微列阵技术更简单应用更广泛^[28]。而在本研究中采用特异引物对 P₁P₂ 的 RT-PCR 检测, 只能扩增到一条 158 bp 特异条带, 无法区分 NM-001066006 和 NM-001066009 的表达, 采用一种功能基因扩增多态性 (Functional genes amplified polymorphism, FGAP) 方法中的组合引物对 P₃P₂, 进行 cDNA 序列扩增, 在 CsA 作用下, 简便有效地区分 NM-001066006 和 NM-001066009 的表达, 并对图 3, 4 中约 530 bp 条带是在 NM-001066006 中处于 195 bp 内含子, 而在 NM-001066009 中却处于 102 bp 外显子作出合理的解释, 由此, FGAP 为 mRNA 选择性剪接的研究提供了一个简便有效方法。

参考文献:

[1] 戴素明, 周程爱, 谢丙炎, 等. 细胞色素 P450 表达在植

物防御反应中的作用[J]. 石河子大学学报, 2004, 22: 184—187.

- [2] 任 彭, 刘兆平. 细胞色素 P450 研究概况及其应用[J]. 食品与药品, 2006, 10(8): 8—12.
- [3] 朱大岭, 韩维娜, 张 荣. 细胞色素 P450 酶系在药物代谢中的作用[J]. 医药导报, 2004, 23(7): 440—443.
- [4] Hu J, Vick B A. Target region amplified polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping[J]. Plant Mol Biol Rep, 2003, 21: 289—294.
- [5] Liu W, Li P J. The research progress of plant cytochrome P450 enzymes and the irrelationship with xenobiotics[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2001, 2(5): 2—9.
- [6] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 107—130.
- [7] 成 碟, 徐为人, 刘昌孝. 细胞色素 P450 遗传多态性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(12): 1409—1414.
- [8] 王正超, 周妙姬, 叶杏婵, 等. 利福平对盐胁迫下水稻活性氧代谢的影响[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 0549—0553.
- [9] 方良俊, 杨科伟, 简 倩. 诱抗剂对水稻耐盐性的特效诱导试验[J]. 广东农业科学, 2006, 4: 10—13.
- [10] 陈 晓, 方良俊, 朱志凯, 等. 盐胁迫下诱抗剂对水稻三个细胞色素 P450 基因差异表达的分析[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 28—32.
- [11] 许 丽, 李珂莹, 邹剑秋, 等. 高粱微卫星非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳条件的优化[J]. 2007, 35(5): 328—329.
- [12] 张志峰, 史洪才, 武 坚, 等. 微卫星 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)银染法的改良[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 51—53.
- [13] 李拥军, 敖 红, 孙桂金. mRNA 差异显示技术中特异条带回收方法的比较[J]. 生物技术通报, 2005, 15(3): 43—44.
- [14] Harvey M, Rissun I, Guerin S L. A simple apparatus for fast and inexpensive recovery of DNA from polyacrylamide gels[J]. Biotechnique, 1993, 14: 943—947.
- [15] 王尧河, 夏贞彪, 杨 毅. mRNA 差异显示技术中差异条带的回收与在扩增[J]. 中国肿瘤临床, 1990, 26(5): 350—351.
- [16] Liang-Jun Fang, Xiao-Qin Fu, Qun-Shan Ye, et al. Effects of P-glycoprotein inhibitor and elicitor on the salt tolerance of rice seedlings[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(5): 588—597.
- [17] Immler S, Schroeder G, StPierre B, et al. Indole alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase[J]. Plant J, 2000, 24: 797—804.
- [18] Lopes M I, Cardoso á A H, Meijer á S, et al. A promoter region that controls basal and elicitor-inducible expression lev-

els of the NADPH; cytochrome P450 reductase gene (Cpr) from *Catharanthus roseus* binds nuclear factor GT-1[J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 256: 674—681.

[19] 钱晓龙, 周建光. 寻找 mRNA 的选择性剪切[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18: 660—663.

[20] 曾纪晴, 张明永. 选择性剪接在植物逆境相关基因表达调控中的作用[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(6): 1005—1014.

[21] Lianfeng Gu, Rongfa Guo. Genome-wide detection and analysis of alternative splicing for nucleotide binding site-leucine-rich repeats sequences in rice[J]. *Genetics* 2007, 34(3): 247—257.

[22] Haas B J, Delcher A L, Mount S M, *et al.* Improving the *Arabidopsis* genome annotation using maximal transcript alignment assemblies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(19): 5654—5666.

[23] Shi H, Xiong L, Stevenson B, *et al.* The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 575—588.

[24] 王 睿, 向 倩, 陈 骥 等. 细胞色素 P450 氧化酶基因多态性对药物代谢影响的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2004, 2: 55—59.

[25] Chambers S K, Hait W N, Kacinski B M, *et al.* Enhancement of anthracycline growth inhibition in parent and multidrug-resistant chinese hamster ovary cells by cyclosporin A and its analogues[J]. *Cancer Res*, 1989, 49: 6275—6279.

[26] Hait W N, Stein J M, Koletsky A J, *et al.* Activity of cyclosporin A and a non-immunosuppressive cyclosporin on multidrug resistant leukemic cell lines[J]. *Cancer Commun*, 1989, 1: 35—43.

[27] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *Immunol Methods*, 1983, 65: 55—63.

[28] Kim N, Lim D, Lee S, *et al.* ASePCR: alternative splicing electronic RT-PCR in multiple tissues and organs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 681—685.