

红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 *atp6* 基因转录本的编辑位点研究*

易平 汪莉 孙清萍 朱英国**

(武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要 以红莲 (HL) 型水稻细胞质雄性不育系 A、保持系 B 及杂种一代 F₁ 为材料, 首次比较研究了红莲型水稻线粒体 *atp6* 基因转录本的编辑位点及各位点的编辑频率. 结果表明 *atp6* 基因的转录本有 18 个编辑位点, 其中有 15 个发生在密码子的第一和第二位点上, 这些位点的编辑最终会导致氨基酸种类的变化. 18 个编辑位点在 A、B 和 F₁ 中没有差异, 但各位点的编辑频率在引入了核恢复基因的条件下发生了较大的变化, 完全编辑的比例增加. 这些结果首次证明 HL 型细胞质雄性不育与线粒体 *atp6* 转录本的编辑有一定相关性, 编辑不充分的转录产物最终会干扰线粒体功能的正常发挥.

关键词 线粒体, RNA 编辑, 编辑位点, 编辑频率, 细胞质雄性不育

学科分类号 S511

RNA 编辑现象最早是在原生动物的线粒体中发现的^[1], 后续的研究证实了该现象的普遍性. RNA 编辑不仅存在于许多真核生物的线粒体中, 在细胞核和叶绿体中亦有所发现^[2~4]. Schuster 等^[5] 估测在植物线粒体中存在的编辑位点超过 1 000 个. RNA 编辑一般是指由 RNA 水平的核苷酸改变引起密码子发生变化的一种预定修饰^[6], 它使转录产物的核苷酸序列不能忠实地反映模板 DNA 的一级序列. 目前已知, 植物线粒体中几乎所有已被检测到的编码蛋白质的转录物都被编辑. 因此, RNA 编辑的正常与否对线粒体功能正常发挥的影响是显而易见的. 由于高等植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 普遍被认为与线粒体内存在的嵌合基因或阅读框密切相关^[7,8], 已有一些学者将 RNA 编辑与 CMS 联系起来, 以便了解二者之间可能存在的关系^[9~11]. 红莲型 CMS 是国内外公认的一类新的不育类型, 也是当前超级杂交组合选育的优质种质资源, 它的发现改变了我国杂交水稻亲本资源选用贫乏和不育胞质单一的局面. 因此本文以水稻红莲型 CMS 不育系 A, 保持系 B 和杂种一代 F₁ 为材料, 比较研究了线粒体 *atp6* 基因转录本的编辑位点及各位点的编辑频率.

1 材料和方法

1.1 材料

红莲型水稻细胞质雄性不育系粤泰 A, 保持系

粤泰 B 和杂种一代 F₁ (红莲一号).

1.2 方法

1.2.1 线粒体 DNA 和 RNA 的提取. 线粒体 DNA 提取的具体操作详见文献 [12], 线粒体总 RNA 的提取使用 TRIZOL 试剂.

1.2.2 线粒体总 RNA 的 DNase 处理. DNase 购自 GIBCO 公司. 反应体系为: 总线粒体 RNA 10 μg, 10× DNase 缓冲液 5 μl, DNase (1 U/μl) 5 μl, 加 DEPC 处理过的 H₂O 至总体积 50 μl. 37℃ 温育 30 min 后, 加入 1/10 体积的 10× 终止反应缓冲液. 用水饱和酚: 氯仿 (24: 1) 和氯仿依次抽提纯化, 无水乙醇沉淀, DEPC 处理 H₂O 溶解, -70℃ 保存备用.

1.2.3 扩增及测序引物. 根据水稻已知 *atp6* DNA 序列^[13] 设计 3 个引物, 分别用于扩增和测序. P₁: 5'-cccttctaggagcagg-3', P₂: 5'-tggcaatccttgtagag-3', P₃: 5'-ctaaaatctcggtctctcg-3'. 上述引物由上海博亚公司合成.

1.2.4 反转录、扩增和序列测定. 反转录体系为: mtRNA 5 μg, 5× M-MLV 缓冲液 5 μl, dNTPs (10 μmol/L) 2 μl, 引物 (10 μmol/L) 1 μl, RNasin (200 U/μl) 0.2 μl, M-MLV (200 U/μl) 2 μl, 总反应体积为 25 μl; 步骤是: mtRNA 65℃ 变性

* 国家自然科学基金资助项目 (3070568).

** 通讯联系人. 武汉大学生命科学院遗传研究所, 武汉 430072.

Tel: 027-87876530, E-mail: zhuyg@public.wh.hb.cn

收稿日期: 2002-01-04, 接受日期: 2002-01-31

5 min, 冰浴冷却 5 min 以上, 迅速加入上述各成分后, 42 °C 温浴 60 min, 70 °C 变性反转录酶 15 min, -20 °C 保存备用. PCR 反应体积为 25 μ l, 其中 Taq 酶 1.0 U, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 10 \times 缓冲液 2.5 μ l, dNTPs 200 μ mol/L, DMSO 1 μ l, 反转录产物 1 μ l 或模板 mtDNA 60 ng, 上、下游引物均为 0.2 μ mol/L; 程序为 94 °C 2 min, 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存. 测序工作由上海博亚公司完成, 各编辑位点的定量分析参考文献 [14], 采用序列图上同一位点 T 与 T + C 碱基的峰高比作为该位点的编辑频率, 即编辑频率 = $h_T / (h_C + h_T) \times 100\%$, 最终结果是三次重复的平均值.

2 结 果

RNA 编辑位点主要是通过比较 DNA 与 cDNA 序列而获得, 也可通过比较核苷酸与氨基酸的序列而获得, 本文使用的是前一种方法.

atp 6 基因的 DNA 和 cDNA 片段大小一致, 均在 1 000 bp 左右. DNA 的序列 (图 1) 分析结果在 A、B 和 F₁ 中完全一致, cDNA 与 DNA 序列的比较证明 *atp 6* 转录本的编码区域内存在 18 个编辑位点 (图 1). 其中有 10 个发生在密码子的第 2 位点, 5 个在第 1 位点上, 这 15 个位点的编辑最终将导致氨基酸种类的变化 (表 1). 18 个编辑位点中的剩余 3 个发生在密码子的第三位点上. 第 18

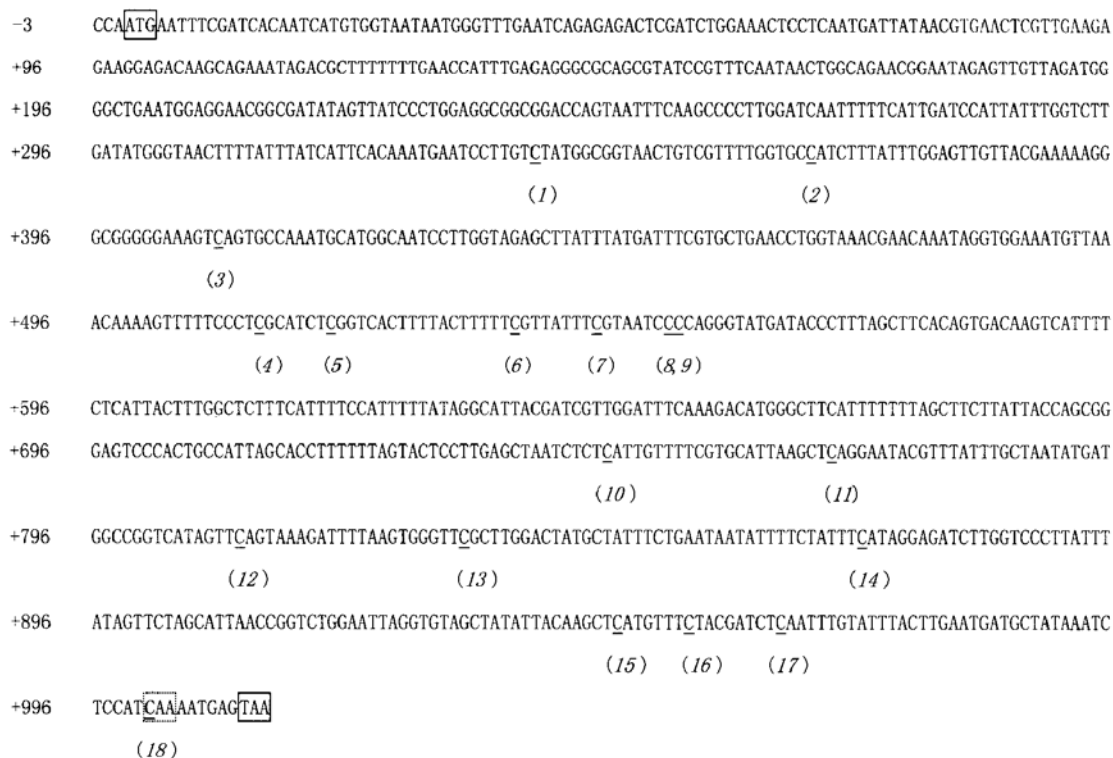


Fig. 1 RNA editing sites and DNA sequence of *atp 6* gene

Initiation and stop codon are respectively boxed with hard lines. Putative stop codon is boxed with broken lines. Editing sites are underlined.

Table 1 RNA editing sites of *atp 6* gene of HL-type rice

site	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
DNA	TCT	CCA	TCA	CGC	TCG	TCG	CGT	CCC	CAT	TCA	TCA	TTC	TTC	CAT	TCT	TCA	CAA	
amino acid	Ser	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Arg	Pro	His	Ser	Ser	Phe	Phe	His	Ser	Ser	Gln	
cDNA	TTT	CTA	TTA	TGC	TTG	TTG	TGT	CTT	TAT	TTA	TTA	TTT	TTT	TAT	TTT	TTA	TAA	
amino acid	Phe	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Cys	Leu	Tyr	Leu	Leu	Phe	Phe	Tyr	Phe	Leu	stop	

The sites of the 8th and 9th can be co-edited.

个位点的编辑引入了一个终止密码子, 距其下游的第 3 个密码子是依据 DNA 序列推测的终止密码子。

cDNA 序列的比较表明 *atp 6* 转录本的编辑位点在 A、B 和 F₁ 中没有差异, 差异表现在各位点的编辑频率的变化上 (表 2)。A 中各位点的编辑频率均低于 B 中的, 但二者相差不很显著, 差异范围大约在 2%~10% 左右。各位点的编辑频率在

F₁ 中得到了较大幅度的增加。如第 1 位点, 在 A、B 中的编辑频率分别是 68% 和 78%, 在 F₁ 中则上升到 97%, 这使得不完全编辑的比例降低。值得注意的是第 13 和 14 位点的编辑频率在 A、B、F₁ 中几乎没有差异, 接近于不编辑。这可能与这两个位点的编辑是发生在密码子的第三位点上, 不引起密码子潜力变化的性质有关。

Table 2 editing frequency of all editing sites of *atp 6* gene among sterile line A, maintainer line B and hybrid F₁ of HL-CMS rice

Frequency	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
A	68	70	79	77	71	80	76	50	56	74	67	73	4	3	81	80	82	82
B	78	74	81	80	77	85	80	58	62	84	71	80	4	4	86	84	87	86
F ₁	97	98	98	100	96	100	98	74	85	100	98	100	3	4	100	98	100	100

3 讨 论

RNA 编辑现象普遍存在于高等植物包括单子叶和双子叶植物的线粒体中, 在迄今已知的所有维管植物线粒体中均发现了 RNA 编辑现象^[15]。高等植物线粒体中 RNA 编辑一般优先选择转录本的蛋白质编码区, 大多数为 C-U 的转换, 主要作用于密码子的第 1 及第 2 位点上, 这常常导致编码的氨基酸种类发生变化^[4]。本文的结果再一次证实 RNA 编辑的这些特点。cDNA 与 DNA 序列的比较证明 *atp 6* 转录本的编码区域内存在 18 个编辑位点, 其编辑形式均为 C-U 的转换。18 个编辑位点

中有 15 个发生在密码子的第 1 和第 2 位点上, 并最终导致氨基酸种类的变化; 只有 3 个发生在第 3 位点, 且没有产生任何影响。

植物线粒体 RNA 编辑有多种生物学意义, 包括增加线粒体编辑蛋白在氨基酸序列上的保守性和创造新的起始密码子和终止密码子等。内含子位置及 tRNA 编辑有可能涉及到改变剪接位点和二级结构。*atp 6* mRNA 的第 18 个位点的编辑引入了一个终止密码子, 该终止密码子的作用及引入的意义还有待于进一步的研究。对不同植物 *atp 6* mRNA 各编辑位点改变密码子的作用效果进行比较之后, 可以发现二个明显的倾向 (表 3)。一是 RNA 编辑增

Table 3 Comparison of editing sites of *atp 6* transcripts in rice, maize^[16], wheat^[17], sorghum^[18] and petunia^[19]

plant	site amino acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9
			340(nt)	367(nt)	409(nt)	513(nt)	520(nt)	538(nt)	546(nt)	553(nt)
Rice		S-F	P-L	S-L	R-C	S-L	S-L	R-C		P-L
Maize		S-F	L-L	S-L	C	S-L	S-L	R-C	P-L	no
Wheat		Y	L	S-L	R-C	S-L	S-L	R-C	P-L	no
Sorghum		S-F	L-L	S-L	C	S-L	S-C	P-L	P-L	no
Petunia		P-S	L	S-L	R-C	S-L	S-L	R-C	P-L	no
plant	site amino acid	10	11	12	13	14	15	16	17	18
		747(nt)	769(nt)	811(nt)	833(nt)	872(nt)	948(nt)	955(nt)	964(nt)	1002(nt)
Rice		H-Y	S-L	S-L	L	L	H-Y	S-F	S-L	Q ⁻ *
Maize		H-Y	S-L	S-L	L	S-L	H-Y	S-F	S-L	Q ⁻ *
Wheat		Y	L	L	L	S-L	H-Y	S-F	S-L	Q ⁻ *
Sorghum		H-Y	S-L	S-L	L	S-L	H-Y	S-F	S-L	Q ⁻ *
Petunia		Y	S-L	S-L	L	S-L	H-Y	S-F	L	Q ⁻ *

"no" represents not editing. * represents stop codon. The numbers refer to the nucleotide positions at which editing occurred, and the nucleotide is according to rice genomic sequence. The nucleotides at 553 and 554 in rice can be co-edited.

加了编码蛋白在氨基酸序列上的保守性; 另一个是提高了编码蛋白的疏水性, 如以 Phe、Leu 代替 Ser, 均是以非极性氨基酸取代极性氨基酸. 疏水性的增加可能与 *atp 6* 蛋白是线粒体内膜结合蛋白的特性有关.

现已有一些研究表明, CMS 产生的原因可能源于线粒体 RNA 编辑的不充分或偏离. 这些非正确的编辑产物会妨碍线粒体功能的正常发挥. 例如, CMS 高粱线粒体 *atp 6* 的编辑频率在花药中急剧降低^[10], 不含有恢复基因 (restorer of fertility, *Rf*) 的任何核背景均不能改变这一现象, 而 *Rf* 存在的条件下 *atp 6* 转录本的编辑频率得以恢复^[11]. BT-CMS 水稻的研究结果表明 *atp 6* 转录本近 3' 端有 9 个编辑位点, 这些位点在 A、B 和有 *Rf* 存在条件下, 不发生改变, 但各位点的编辑频率在 *Rf* 的作用下均有较大提高^[20]. 由于 BT-CMS 水稻的研究仅仅只涉及 3' 端的一段序列, *atp 6* 基因整个编码区的其他编辑位点的研究至今无人问津, 且 *atp 6* 基因在 HL-CMS 不育系与保持系之间存在 DNA 和 RNA 水平的差异^[21,22], 故本文把 *atp 6* 基因作为研究对象. HL 型水稻 *atp 6* 基因的转录本有 18 个编辑位点, 其中近 3' 端的 9 个与 BT-CMS^[20] 中的一致. 这 18 个编辑位点在 A、B 与 F₁ 之间没有差别, 但各位点编辑频率在核背景改变后发生了较大的变化. 在 BT-CMS 品系中, 近 3' 端的 9 个编辑位点的编辑频率也呈现相同的变化趋势. 由于 BT-CMS 和 HL-CMS 均为配子体 CMS, 这些结果的吻合表明, 这两种 CMS 在不育的分子机理方面可能存在一定的相似性. 由于 A、B 是同核异质材料, 即 A 与 B 具有相同的核背景, 但胞质来源不同, 所以 A 与 B 各位点在编辑频率上存在差异是可以理解的. A 与 F₁ 具有相同的胞质, 但各自的核背景不同, 在 F₁ 的核背景中有 *Rf* 存在. 在研究 *atp 6* 基因的同时, 我们对 *cox II* 基因 (另文详细报道) 也进行了研究. *cox II* mRNA 的 15 个编辑位点及各位点的编辑频率在 A、B 与 F₁ 之间均没有差别. 由以上这些结果可以初步推断, HL-CMS 线粒体 *atp 6* mRNA 各位点编辑频率在 A 与 F₁ 之间的变化是源于核背景的改变, 源于 *Rf* 的引入.

目前, 国内在 RNA 编辑, 尤其在线粒体基因的 RNA 编辑方面的研究工作还尚未开展. 本文首次对 HL 型水稻线粒体基因——*atp 6* 转录本的编辑进行了初步研究, 其结果一方面可为深入开展这

一方面的工作奠定基础, 另一方面也将有助于进一步研究 RNA 编辑与 HL-CMS 的相关性, 进而阐明 HL-CMS 的分子机理.

参 考 文 献

- 1 Benne R, Van-Den B J, Brakenhoff J P, *et al.* Major transcript of the frameshifted *cox II* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 1986, **46** (8): 819~ 826
- 2 Brennicke A, Felder A M, Binder S. RNA editing. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, **23**: 297~ 316
- 3 Cattaneo R. Different types of messenger RNA editing. *Annu Rev Genet*, 1991, **25**: 71~ 88
- 4 Gray M W, Hanic-Joyce P J, Covello P S. Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, **43**: 145~ 175
- 5 Schuster W, Brennicke A. The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing and gene migration to nucleus. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, **45**: 61~ 78
- 6 Covello P S, Gray M W. RNA editing in plant mitochondria. *Nature*, 1989, **341** (19): 662~ 666
- 7 Hanson M R. Plant mitochondria mutations and male sterility. *Annu Rev Genet*, 1991, **25**: 461~ 486
- 8 Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 1998, **3** (5): 175~ 180
- 9 Begu D, Graves P V, Domec C. RNA editing of wheat mitochondrial ATP: synthase subunit 9: direct protein and DNA sequencing. *Plant Cell*, 1990, **2** (12): 1283~ 1290
- 10 Howad W, Kempken F. Cell type specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasm male sterile sorghum bicolor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (20): 11090~ 11095
- 11 Howad W, Tang H V, Pring D R, *et al.* Nuclear genes from Tx CMS maintainer lines are unable to maintain *atp 6* RNA editing in any anther cell-type in the sorghum bicolor A3 cytoplasm. *Curr Genet*, 1999, **36** (1-2): 62~ 68
- 12 Mignouna H, Vermin S S, Briquet M. Mitochondrial DNA modifications associated with cytoplasmic male sterility in rice. *Thero Appl Genet*, 1987, **74** (5): 666~ 669
- 13 Akagi H, Sakamoto M, Shinjyo C, *et al.* A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp 6* may cause male sterility. *Curr Genet*, 1994, **25** (1): 52~ 58
- 14 Pring D R, Chen W, Tang H V, *et al.* Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male sterility in sorghum. *Curr Genet*, 1998, **33** (6): 429~ 436
- 15 Malek O, Lattig K, Hiesel R, *et al.* RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO J*, 1996, **15** (6): 1403~ 1411
- 16 Kumar R, Levings C S III. RNA editing of chimeric maize mitochondrial gene transcripts is sequence specific. *Curr Genet*, 1993, **23** (2): 154~ 159
- 17 Kurek I, Ezra D, Begu D, *et al.* Studies on the effects of nuclear background and tissue specificity on RNA editing of the mitochondrial ATP synthase subunits 6 and 9 in fertile and cytoplasmic male-sterile (CMS) wheat. *Thero Appl Genet*, 1997, **95** (8): 1305~ 1311
- 18 Kempken F, Mullen J A, Pring D R, *et al.* RNA editing of sorghum mitochondrial *atp 6* transcripts changes 15 amino acids and

- generates a carboxy-terminus identical to yeast. *Curr Genet*, 1993, **20** (5): 417~ 422
- 19 Lu B, Hanson M R. A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited *atp6* transcripts. *Plant Cell*, 1994, **6** (12): 1955~ 1968
- 20 Iwabuchi M, Kyojuka J, Shimamoto K O. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *The EMBO J*, 1993, **12** (4): 1437~ 1446
- 21 李小明, 郑用琰, 张方东, 等. 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析. *遗传*, 2000, **22** (4): 201~ 204
Li X M, Zheng Y L, Zhang F D, *et al.* *Heredity*, 2000, **22** (3): 201~ 204
- 22 凌杏园. 水稻细胞质雄性不育线粒体 DNA 片段的克隆: [学位论文]. 武汉: 武汉大学博士学位论文, 1999
Ling X Y. Isolation of mitochondrial DNA fragments associated with cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.): [Ph D Dissertation]. Wuhan: Wuhan University, 1999

Study on The Editing Sites in The Transcript of *atp6* Gene of HL-Rice Mitochondria*

YI Ping, WANG Li, SUN Qing-Ping, ZHU Ying-Guo**

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Plant Developmental Biology and Institute of Genetics,
College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract RNA editing is a process in which the genetic information of a gene transcript is changed during or after transcription. RNA editing exists extensively in the higher plant mitochondria, and is a necessary step for forming functional proteins. There may be some relationship between RNA editing and cytoplasmic male sterility (CMS), a kind of phenomenon that is closely associated with mitochondrial genome mutations. The research materials were the gametophyte male sterility line (A), maintainer line (B) and F₁ hybrid (F₁) of HL-type CMS. cDNAs and DNAs of *atp6* were obtained from A, B and F₁ by PCR and RT-PCR. Then sequences of cDNAs and DNAs are compared: A, B and F₁ share the same 15 editing sites found in the transcripts of *atp6*. The restorer gene in F₁ greatly changed the editing frequency of each editing site. So it is suggested that HL-type CMS is associated with RNA editing of *atp6*.

Key words mitochondria, RNA editing, editing sites, editing frequency, cytoplasmic male sterility

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (3070568).

** Corresponding author. Tel: 86-27-87876530, E-mail: zhuyg@public.wh.hb.cn

Received: January 4, 2002 Accepted: January 31, 2002