

# 川草 2 号老芒麦 (*Elymus sibiricus* L.) *atpA* 基因的克隆及其调控表达\*

何文兴 徐莺 唐琳 魏琴 李静 陈放\*\*

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

**摘要** ATPase 与植物的耐寒性密切相关. 运用 mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR) 从耐寒植物川草 2 号老芒麦 (*Elymus sibiricus* L. cv. 'chuancao No.2') 中获得了受冷抑制的 *atpA* 基因表达序列标签 (EST) 序列, 通过 5' cDNA 末端快速扩增 (RACE) 获得了 *atpA* 基因全长 cDNA 为 1 754 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 1 518 bp, 编码 505 个氨基酸. 氨基酸序列与小麦、水稻、玉米 *atpA* 基因分别具有 95%、94%、94% 的相似性. 对 2°C 低温胁迫及解除胁迫后恢复过程中共 13 个时段的 RNA 印迹分析表明, *atpA* 基因在低温胁迫 12 h 转录受到强烈抑制, 在低温胁迫开始后的 4~8 h 及解除胁迫后的 16~24 h, 其转录水平明显强于对照. 实验结果为揭示 CF<sub>1</sub> α 亚基对调控 ATPase 在植物御冷性反应的作用, 以及 α 亚基在植物低温信号转导中的作用提供了新的线索.

**关键词** *atpA* 基因, mRNA 差异显示 (DDRT-PCR), 低温胁迫, 川草 2 号老芒麦

学科分类号 Q786

ATPase 广泛存在于线粒体、叶绿体、原核藻、异养菌和光合细菌中, 参与氧化磷酸化与光合磷酸化反应, 是能量代谢的关键酶<sup>[1,2]</sup>. 近年来的研究表明, 其活性与植物的抗寒性密切相关, 陈亚华等<sup>[3]</sup>在研究水稻耐寒性时发现, 耐寒品种在 8°C 低温胁迫 2 天时, ATPase 活性明显升高, 12 天时仍维持对照水平, 而不耐寒品种在低温胁迫下 ATPase 活性增加不明显或下降. Arora 和 Palta<sup>[4]</sup>的研究也得出了 ATPase 活性的恢复与非致死性冰冻-化冻伤害恢复相一致的结论. Yoshiday<sup>[5]</sup>在研究植物低温伤害后认为, 冷敏植物低温伤害的主要原因是冷诱导的细胞质酸化, 而耐寒植物在受到低温胁迫时能维持较高的 ATPase 活性, 有效防御细胞质酸化, 这是耐寒植物具有抗寒性的重要原因.

叶绿体 ATPase 由镶嵌于膜内的 CF<sub>0</sub> 和突出于膜外的 CF<sub>1</sub> 两部分组成<sup>[6]</sup>, CF<sub>0</sub> 由 I、II、III、IV 4 种亚基组成, 是一个疏水蛋白复合体, 形成跨膜的质子通道, 并为 CF<sub>1</sub> 提供膜上的结合位点; CF<sub>1</sub> 是 ATPase 的亲水部分, 具有 ATPase 活性, 由 α、β、γ、δ、ε 5 种亚基组成, 其分子组成为 α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδ ε<sup>[7]</sup>, CF<sub>1</sub> 有 6 个核苷酸结合位点, 其中 3 个在 β 亚基上, 是催化位点, 另 3 个在 α 亚基上, 为非催化位点, 主要起调节作用<sup>[8]</sup>. α 亚基在调控 ATPase 活性中的作用越来越受到人们的关注, Tucker 和 Schnick 等<sup>[9-11]</sup>在研究链格孢毒素对 ATPase 的抑制作用时发现, α 亚基起着重要的调控作用. Groth

等<sup>[12]</sup>提出: 只有当 ANPP (4-叠氮-2-硝基苯磷酸) 与 ATPase α 亚基结合时, ANPP 才能抑制 ATPase 水解活性. 另外 ATPase α 亚基还会影响酶与反应底物<sup>[13-15]</sup>以及与钾离子<sup>[16,17]</sup>等的结合. 近几年的研究发现, α 亚基还做为受体蛋白的配基在动物细胞的信号转导中发挥着重要的作用<sup>[18,19]</sup>. 由此可见, ATPase α 亚基不仅在调控酶与反应底物的相互作用中有着重要作用, 而且在生物有机体与外界环境的相互作用中也担任着重要角色.

川西北高原高寒缺氧、光辐射强、气候变化剧烈, 使得生长于该地区的植物有着极强的抗逆性. 川草 2 号老芒麦是具有抗寒、耐湿特性的优良禾本科牧草, 有关其在低温胁迫下适应机制的探讨对揭示植物的耐寒性有着重要意义. 目前关于 ATPase 活性与低温逆境关系的报道较多<sup>[3,20-22]</sup>, 而 ATPase α 亚基与植物低温逆境关系的研究未见报道. 本文运用 mRNA 差异显示技术及 5' cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆了与低温胁迫相关的 ATPase α 亚基基因 (*atpA*), 并用 RNA 印迹证明 *atpA* 基因的表达与低温胁迫密切相关.

\*国家“十五”科技攻关计划重大项目 (2001BA606A-11).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 028-85417281, E-mail: cfang@263.net

收稿日期: 2004-08-10, 接受日期: 2004-09-28

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及低温处理

以四川省草原研究所培育的川草 2 号老芒麦 (*Elymus sibiricus* L. cv. 'chuancao No.2') 为实验材料, 种群群体年龄为 3 年. 川草 2 号老芒麦由野外直接移栽入花盆内, 转入人工气候箱中(25°C, 光强为  $1 \times 10^{-8} \text{J} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ , 12/12 h 光暗周期), 适应生长一周后分成冷处理组和对照组, 冷处理组的温度为 2°C, 对照组温度为 25°C. 在低温处理开始后的 0、4、8、12、24、36、48、60、72 h 时, 分别对冷处理组和对照组同步取样(取样部位为从形态学顶部往下数第 2 片完全展开的功能叶片). 72 h 后解除低温胁迫, 并在解除低温胁迫后的 8、16、28、40 h (72~112 h) 分别对处理组和对照组取样.

### 1.2 试剂

“Plant (leaves) RNA Mini Kit” 总 RNA 抽提纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司); “SuperScript<sup>TM</sup> III Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase” 试剂盒(Invitrogen 公司); “Delta<sup>®</sup> Differential Display Kit” 差异显示试剂盒(Clontech 公司); “DNA Gel Extraction Kit” DNA 纯化试剂盒(V-gene 公司); “pMD 18-T Vector” T 载体(TaKaRa 公司); “DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II” 杂交试剂盒(Roche 公司); “SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit” RACE 扩增试剂盒(Clontech 公司); 引物(除试剂盒自带外)由 TaKaRa (大连) 公司合成(表 1), 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂. 序列由上海生工生物工程有限公司测定.

**Table 1 The list of primers and sequences**

Primers	Sequences
Oligo(dT) anchored	5' ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTMMN 3' (N=A,C,G or T;M=A,G or C)
Arbitrarily primers(ARPs)	M13r ARP5: 5' ACAATTTACACAGGAATGGTATGCA 3' M13r ARP7: 5' ACAATTTACACAGGAGATGACCGCC 3' M13r ARP9: 5' ACAATTTACACAGGATTATCCAGGG 3'
Anchored primers(APs)	T7(dT12)AP3: 5' ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTGG 3' T7(dT12)AP6: 5' ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTC 3' T7(dT12)AP8: 5' ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTA 3'
The recovery of different fragments	M13 reverse: 5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3' T7 promoter: 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
SMART II A oligonucleotide	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'
5' RACE CDS Primer	5' (T) <sub>25</sub> N <sub>1</sub> N 3' (N=A,C,G or T;N <sub>1</sub> =A,G or C)
Gene specific primer(GSP)	5' GAGTCTCAACTATTGGTAAAGCGGT 3'
10× Universal primer mix (UPM)	Long: 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3' Short: 5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3'

### 1.3 川草 2 号老芒麦叶片总 RNA 提取

称取叶片 100 mg, 用灭菌去离子水反复冲洗干净后在液氮中研磨, 按试剂盒说明提取叶片总 RNA, 经分光光度法和电泳法鉴定质量后用于实验.

### 1.4 mRNA 差异显示分离差异片段

将 2°C 低温胁迫处理 12 h 提取的叶片总 RNA 及对照 RNA, 用 SuperScript<sup>TM</sup> III Rnase H<sup>-</sup> 反转录试剂进行 cDNA 合成. 按冷处理组与对照组分为 2 个反应体系, 每个体系总体积为 20 μl. 组分及操作如下: 总 RNA 投入量 2 μg, 2.5 μmol/L 锚定引物, 0.5 mmol/L dNTPs, 加无核酸酶的灭菌去离子水至总体积 13 μl, 65°C 温浴 5 min 后, 立即冰浴

2 min, 短暂离心收集壁液, 加入 4 μl 5 × First-Strand 缓冲液, 1 μl 0.1 mol/L DTT, 1 μl 40 U/μl 的 RNase Inhibitor, 1 μl 200 U/μl 的 SuperScript III RT 酶, 混匀反应体系, 于 50°C 保温 50 min, 70°C 温浴 15 min, 迅速冰浴, 保存于 -20°C 备用.

差异显示 PCR 反应体系为 20 μl: 1 μl cDNA 混合物, 2 μl 10 × PCR 缓冲液 (不含 MgCl<sub>2</sub>), 3.75 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 μmol/L dNTPs, 0.35 μmol/L 锚定引物, 0.35 μmol/L 上游引物, 0.06 U/μl Tag 酶, 加灭菌去离子水至总体积为 20 μl. PCR 扩增条件为 (PTC-100<sup>TM</sup> (MJ) 热循环仪): 95°C 2 min, 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 2 min, 5 个循环; 94°C

30 s, 60°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 7 min. 取 PCR 产物 4  $\mu$ l 加入 2  $\mu$ l 上样缓冲液, 95°C 变性 5 min, 取 4  $\mu$ l 上样, 用 6% 变性高分辨率聚丙烯酰胺凝胶电泳 6 h (80 W, 2 600 V, 55°C), 用常规银染后挑选差异带。

### 1.5 差异片段的二次扩增

将差异片段从凝胶上切下, 放入 0.5 ml EP 管中, 用无菌水冲洗凝胶块 3~5 次, 将凝胶块捣碎, 加入 30  $\mu$ l TE (1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 缓冲液, 在 37°C 水浴 45 min, 保存于 4°C 备用。第二次 PCR 反应体系为 50  $\mu$ l: 4  $\mu$ l cDNA 回收片段, 1 $\times$ PCR 缓冲液, 50  $\mu$ mol/L dNTPs, 0.2  $\mu$ mol/L M13 引物, 0.2  $\mu$ mol/L T7 引物, 0.04 U/ $\mu$ l Taq 酶及灭菌去离子水, 按第一次 PCR 反应条件进行扩增。

### 1.6 反向 RNA 印迹筛选阳性差异表达片段

二次扩增片段经纯化回收后溶于 30  $\mu$ l TE 缓冲液, 取 4  $\mu$ l 加入等体积 10.6 mol/L NaOH, 37°C 温浴 2 min, 取 1  $\mu$ l 点在尼龙膜上, 80°C 烤膜固定 2 h (同时制备 2 份)。将冷处理 12 h 处理组与对照组总 RNA 用 SuperScript™ III Rnase H<sup>-</sup> 反转录试剂进行 cDNA 合成, 用随机引物标记法对 cDNA 进行探针标记, 分别和上述尼龙膜杂交 (第一轮反向 RNA 印迹)。所获差异片段克隆入 T 载体, 转化大肠杆菌 JM 109, 碱裂解法提取质粒, 按上述方法进行第二轮反向 RNA 印迹, 确认阳性差异表达片段。

### 1.7 5' RACE

5' RACE 是以低温胁迫处理 12 h 总 RNA 为模板, 进行 cDNA 合成: 在 10  $\mu$ l 的反应体系中加入 1  $\mu$ g 川草 2 号老芒麦叶片总 RNA, 1  $\mu$ mol/L 5'-CDS 引物, 1  $\mu$ mol/L SMART II A 寡核苷酸, 加无菌去离子水至总体积 5  $\mu$ l, 于 70°C 变性 2 min, 立即冰浴 2 min 后加入 1 $\times$ First-Stand 缓冲液, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L dNTPs 及 PowerScript 反转录酶 1  $\mu$ l 和灭菌去离子水至总体积 10  $\mu$ l, 混匀体系, 于 42°C 保温 1.5 h 后加入 100  $\mu$ l Tricine-EDTA 缓冲液, 并于 72°C 温浴 7 min 终止反应, 保存于 -20°C 备用。PCR 反应体系组成及扩增条件为: cDNA 2  $\mu$ l, 0.4  $\mu$ mol/L GSP 引物 (基因特异引物), 1 $\times$ UPM 引物 (通用引物), 1 $\times$ PCR 缓冲液, 0.4 mmol/L dNTPs, 0.1 U/ $\mu$ l Taq 酶, 加灭菌去离子水至 20  $\mu$ l。将体系混匀后进行如下 TD-PCR 反应: 94°C 8 min, 94°C 40 s, 68°C

(66°C, 64°C, 62°C, 60°C, 58°C) 50 s, 72°C 2 min, 4 个循环; 94°C 40 s, 56°C 50 s, 72°C 2 min, 25 个循环; 72°C 8 min。PCR 扩增片段克隆入 T 载体中进行测序。同时按照试剂盒所给条件进行 RACE PCR 扩增的阳性及阴性实验。

### 1.8 RNA 印迹分析

分别将冷处理组与对照组 13 个时段的总 RNA 在甲醛变性琼脂糖凝胶 (1%) 中电泳, 用 20 $\times$ SSC 缓冲液通过毛吸法转移至 2 张尼龙膜, 以获得的阳性差异片段为探针, 按照杂交试剂盒操作说明进行 RNA 印迹、压片和曝光, 将杂交图片进行扫描和作图。

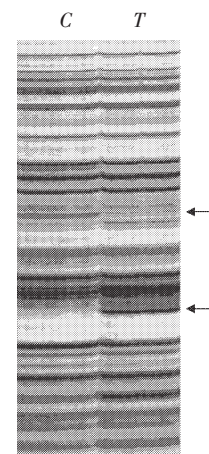
### 1.9 序列分析

将获得的 cDNA 序列通过登录 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与 GenBank 数据库进行同源序列比对; 通过 DNAMAN 软件进行序列拼接与翻译; 通过 ExPasy (<http://WWW.expasy.ch>) 服务器进行蛋白质结构域 (domain)、基序 (motif) 的分析。

## 2 结 果

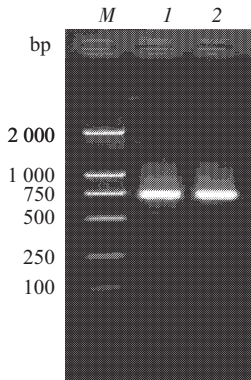
### 2.1 差异片段的分离及回收

通过 3 个锚定引物 (AP3、AP6、AP8) 分别和 3 个随机引物 (ARP5、ARP7、ARP9) 两两组合, 9 对引物进行差异显示 PCR, 共分离到 12 条差异片段 (图 1 显示了部分差异片段), 通过 2 次 PCR 扩增, 回收得到 9 条差异片段, 其中表达上调的有 3 条, 表达下调的有 6 条 (图 2 显示了 2 次 PCR 扩增后得到的编号为 No.3 的片段)。



**Fig.1 Electrophoresis of denaturing polyacrylamide gel of mRNA differential display PCR between control and treatment**

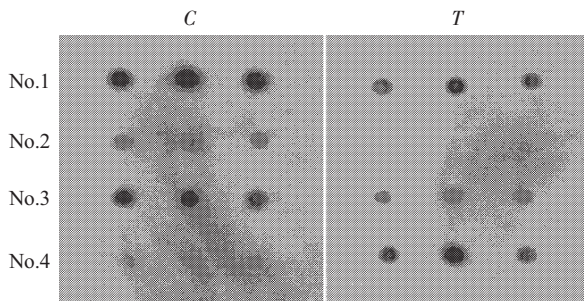
PCR amplification of the resultant cDNA was performed with AP6 and ARP9 as primers; Arrows marked different bands of PCR-amplified cDNA fragments between control and treatment. C: control; T: treatment.



**Fig.2 Agarose gel electrophoresis of differentially expressed gene fragments re-amplified by PCR**  
M: DL2000 marker; 1, 2: No.3 (774 bp).

**2.2 阳性片段的获得**

经 2 轮反向 RNA 点印迹筛选, 从 9 条差异片

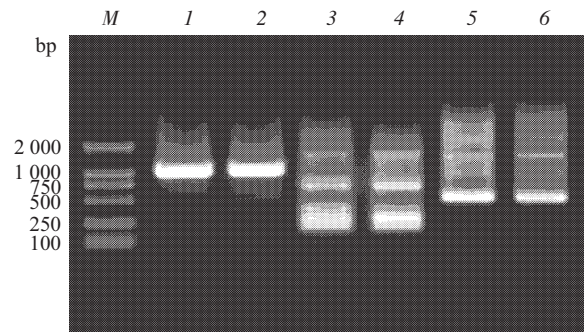


**Fig.3 The results of reverse Northern blot**  
No.1 to No.4: the clone number; C: control; T: treatment.

段中获得了阳性差异表达片段 No.3. 在经低温胁迫后, 其表达信号较对对照明显减弱 (图 3).

**2.3 全长基因的获得及序列分析**

将获得的阳性差异表达片段 No.3 克隆入 T 载体并进行序列测定后得到了一个长度为 774 bp 的 cDNA 片段, 与 NCBI 的 GenBank 数据库进行 Blastn 比对, 发现该片段与 *atpA* 基因有很高的同源性. 随后通过 5' RACE 得到了 No.3 的 5' 端序列 (图 4), 片段大小为 1 090 bp, 与原序列拼接后得到了全长基因的 cDNA 为 1.754 kb (图 5), GenBank 数据库登录号为 AY702719.



**Fig.4 Electrophoresis of 5' RACE amplification of No.3 fragment**

M: DL2000 marker; 1, 2: 5' RACE. The band of 1 090 bp is the cDNA of No.3 gene; 3,4: negative control; 5,6: positive control.

```

1  CCATTCTCGGCTCGGTGGAATGGACGAGATAAATTAATTAATTAGGCTTTGAACCTTCTACTTTTCGTTTAGAATTTAGGCATTATTTTTCCCTTTGCTTC
100 AGAAAAAGAGTCAAGAAACACTAATGGCAACCCTTCGAGTCGACGAAATTCATAAAATTCGCCGGAACGTATTGAACAATATAATAGGAAAGTAGGG
1  T L R V D E I H K I L R E R I E Q Y N R K V G
199 ATTGAGAATATAGTTCGCGTAGTTCAAGTGGGGATGGGATTGCTCGTATTATAGGCTTGGTGAATAATGTCAGGTGAATTAGTCGAATTTGCAGAA
26  I E N I G R V V Q V G D G I A R I I G L G E I M S G E L V E F A E
298 GGTACTAGGGTATGCTCTGAATTTGGAATCCAAAATGTTGGGATGTATTAAATGGGCGATGGGTTGATGATACAGAGGGAAGTTTGTAAAAGCA
59  G T R G I A L N L E S R N V G I V L M G D G L M I Q A E G S F V K A
397 ACAGGAAGAATGCTCAGATACCCGTGAGTGAGGCTTACTTGGGTCGTGTTGTAATGCTCTGGCTAAACCTATGATGGGAGAGGCGAAAATATAGCT
92  T G R I A Q I P V S E A Y L G R V N A L A K P I D G R G E I I A
496 TCCGAATCTCGCTTAATTAATCTCCCGCTCCCGGTATAATTTCAAGACGTTCTGTATATGAACCAATGCAACAGGACTTATTGCTATTGATTCTATG
125 S E S R L I E S P A P G I I S R R S V Y E P M Q T G L I A I D S M
595 ATTCCTATTGGACGCGGTGAGCGGAGTTAATTTGGGACAGACAGACTGGCAAAACAGCAGTAGCCACAGATACAATTTCTCAATCAAAAAGGACAA
158 I P I G R G Q R E L I I G D R Q T G K T A V A T D T I L N Q K G Q
694 AATGTAATATGTGTTTATGATGCTATCGGTCAAAGAGCATCTCTGTGGCTCAAGTAGTAATAATTTCCAGAGGAGGGGCCATGGAATACACTATT
191 N V I C V Y V A I G Q R A S S A Q V V T N F Q E E G A M E Y T I
793 GTAGTAGCTGAAATGGCGGATTCACCTGCTACATTACAATACCTCGCTCCTTATACGGGAGCAGCCCTGGCTGAGTATTTATGTACCGCAACGACAT
224 V V A E M A D S P A T L Q Y L A P Y T G A A L A L A E Y F M Y R E R H
892 ACTTTAATAATTTATGATGATCTCTCCAAACAGGCACAAGCTTATCGCCAATGTCCCTTCTATTAAGAAGACCTCCCGGGCGTGAAGCTTATCCAGGG
257 T L I I Y D D L S K Q A Q A Y R Q M S L L L R R P P G R E A Y P G
991 GATGTTTTTATTTGCATTACGCTTTTAGAAGAGCCGCTAAATTAATTTCTTTTAGCGAAGGAAGTACGCCCTTTACCAATAGTTGAGACT
290 D V F Y L H S R L L E R A A K L N S L L G E G S M T A L P I V E T
1090 CAATCTGGAGACGTTTCTGCCTATATCTACTAATGTAATCTCCATTACAGATGGCAAAATATCTTATCTGCAGATCTATTCATGCCCGAATTCGA
323 Q S G D V S A Y I P T N V I S I T D G Q I F L S A D L F N A G I R
1189 CCTGCTATTAATGTGGTATTTCTGTTTCCAGAGTGGGATCCGCGGCTCAAAATTAAGCCATGAAACAAGTAGCTGGCAAATAAAATTTGGAAGTAGCT
356 P A I N V G I S V S R V G S A A Q I K A M K Q V A G K L K L E L A
1288 CAATTCGCAGAGTTACAAGCTTTGACAATTCGCTCTGCTCTCGATAAAACAGTCAGAATCAATTTGGCAAGGGTTCGACGATTAAGGGAATTCCTT
389 Q F A E L Q A F A Q F A S A L D A K T S Q N Q L A R G R R L R E L L
1387 AAACAATCTCAGGCAAAACCTCTCCAGTGGGAAGAGCAGATGACTACTATTTATACCGGAACGAGAGGATACTTTGATTGCTTAGAGATTGAACAGGTA
422 K Q S Q A N P L P V E E Q I A T T Y T G T R G Y L D S L E I E L A
1486 AATAAATTTCTGGATGAGTTACGTAACACTTAAAAGATACTAAACCTCAATTCGAAGAAATATATCTTCTAGCAAGACATTCACCGAGCAAGCGGAA
455 N K F L D E L R K H L K D T K P T C C Q E I I S S S K T F T F E Q A E
1585 ATCCTTTTGAAGGAAGCTATTTCAGGAACAGCTGGAACGGTTTTCTCTCAGCAATAAACATAAATTTGTATGTCTACTCTTGTAGTAGAAGGAAAT
488 I L L K E A I Q E Q L E R F S L Q Q * *
1684 CGTTGAGAAAGATTTTTTCATTGGATCATTTGAATCATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**Fig.5 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *atpA* full length cDNA from *Elymus sibiricus* L. cv. 'chuancao No.2'**  
The arrow shows GSP primer for 5' RACE.

通过登陆 NCBI 进行 ORF Finder 分析, 发现该全长 cDNA 含有一个编码 505 个氨基酸的开放阅读框架 (起始于第 124 位核苷酸, 终止于第 1 641 位核苷酸). 在起始密码子之前有同一相位的终止密码子 UAA, 3' 端有加尾信号 AATAAA (起始于第 1 637 位核苷酸) 及 polyA. 通过进行蛋白质结构域 (domain) 分析, 发现序列具有 ATPase  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基特征, 其中第 170~177 位氨基酸为 ATP/GTP 结合位点, 413~416 位氨基酸为酰胺化位点 (X-G-[RK]-[RK]), 序列中还存在多处蛋白激

酶 (PKC)、酪蛋白激酶 II (CK2) 的磷酸化位点和 N- 豆蔻酰化位点 (MYRISTYL). 将所获得的全长 cDNA 通过 Blastn、Blastx 与 NCBI 的 GenBank 数据库进行同源性检索, 发现该序列与小麦、水稻、玉米叶绿体 *atpA* 基因的同源性分别为 96% (M16842.1)、95% (AY 522329.1)、94% (X 05255.1); 氨基酸序列的同源性分别为 95% (NP\_114256.1)、94% (AAS46052.1) 和 94% (NP\_043022.1) (图 6).

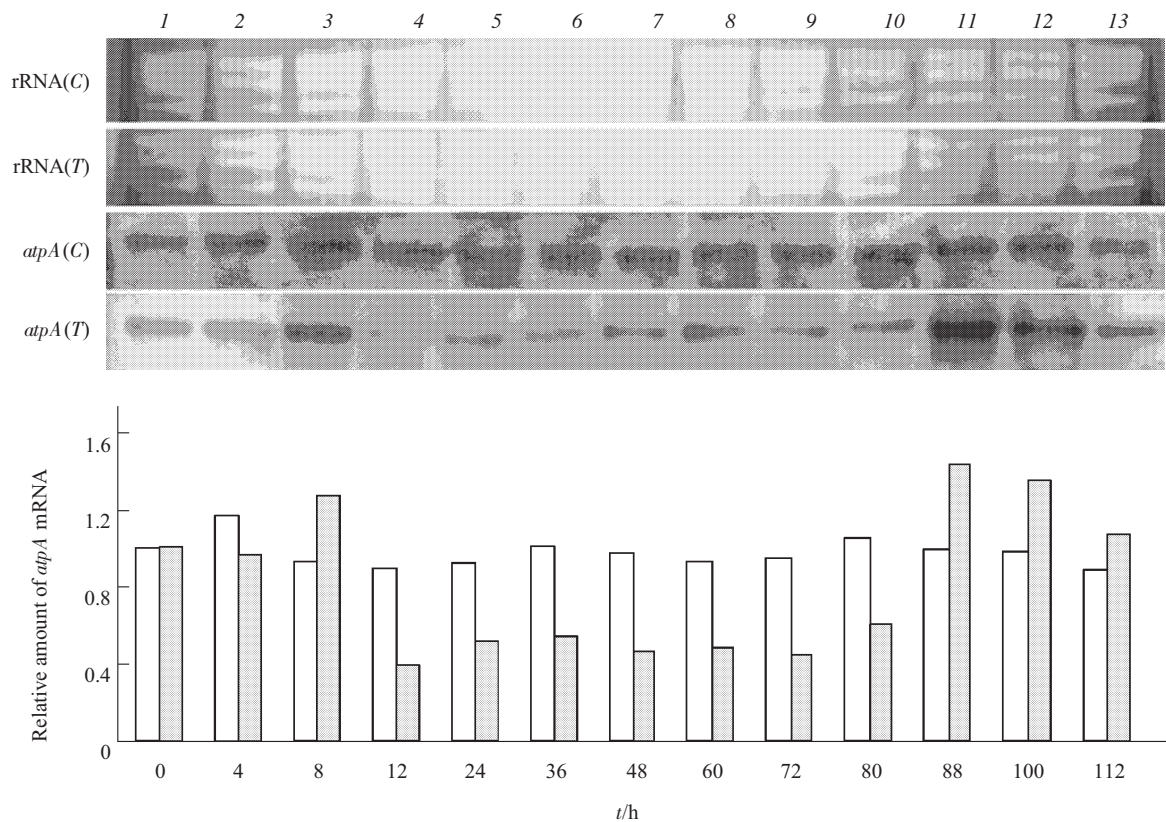
<i>Elymus sibiricus</i>	.....MATLRVDEIHKILRERIEQYNRKVGIENIGRVVQ	34
<i>Triticum aestivum</i>	.....v--l-----	34
<i>Oryza sativa</i>	mnfyfplefrhyfspcfrkksketl-----	60
<i>Zea mays</i>	.....n-----	34
<i>Elymus sibiricus</i>	VG DGIARI IGLGEIMSGELVEFAEGRGIALNLESKNVGI VLMGDGLMIQEGSFVKATGR	94
<i>Triticum aestivum</i>	-----	94
<i>Oryza sativa</i>	-----	120
<i>Zea mays</i>	-----	94
<i>Elymus sibiricus</i>	IAQIPVSEAYLGRV VNALAKPIDGRGEIIASESRLIESPAPGII SRRSVYVEPMQTGLIAI	154
<i>Triticum aestivum</i>	-p-----k-----s-----l-----	154
<i>Oryza sativa</i>	-----i-----v-----l-----	180
<i>Zea mays</i>	-----i-----v-----l-----	154
<i>Elymus sibiricus</i>	DSMIPIGRGQRELIIGDRQTGKTAVATDITILNQKQNVICVYVAIGQRASSVAQVVTNFQ	214
<i>Triticum aestivum</i>	-----g-----t-h	214
<i>Oryza sativa</i>	-----d-----t-h	240
<i>Zea mays</i>	-----d-----t-h	214
<i>Elymus sibiricus</i>	EEGAMEYTIIVVAEMADSPATLQYLAPYTGAAALAEYFMYRERHTLI IYDDLKQAQAYRQM	274
<i>Triticum aestivum</i>	-----	274
<i>Oryza sativa</i>	-----	300
<i>Zea mays</i>	-----	274
<i>Elymus sibiricus</i>	SLLLRPPGREAYPGDV FYLHLSRLLEAAKLNLSLLEGESMTALPIVETQSGDVSAIYIPTN	334
<i>Triticum aestivum</i>	-----	334
<i>Oryza sativa</i>	-----	360
<i>Zea mays</i>	-----l-----	334
<i>Elymus sibiricus</i>	VISITDQGIFLSADLFNAGIRPAINVGVISVSRVGSAAQIKAMKQVAGKLELAQFAELQ	394
<i>Triticum aestivum</i>	-----s-----	394
<i>Oryza sativa</i>	-----s-----	420
<i>Zeamays</i>	-----s-----	394
<i>Elymus sibiricus</i>	AFAQFASALDKTSQNQLARGRRLRELLKQSQANPLPVEEQIATITYTGRGYLDSLEIEQV	454
<i>Triticum aestivum</i>	-----	454
<i>Oryza sativa</i>	-----i-----g--	480
<i>Zea mays</i>	-----s-----v-----	454
<i>Elymus sibiricus</i>	NKFLDELKHLKDKPKQFQEI I SSSKTFTEQAEILLKEAIQEQLERFSLQQ..	505
<i>Triticum aestivum</i>	-----	504
<i>Oryza sativa</i>	k-----e-----egt	533
<i>Zea mays</i>	k-----e-----t-----egt	507

Fig.6 Comparison of amino acid sequences of ATPase  $\alpha$  subunit in *Elymus sibiricus*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* and *Zea mays*

#### 2.4 低温胁迫不同时段 *atpA* 基因表达水平的 RNA 印迹杂交结果

以 *atpA* 基因 cDNA 为探针, 与冷处理组和对照组各 13 个时段叶片总 RNA 的杂交结果表明, 2°C 低温胁迫 4 h, *atpA* 基因的表达没有发生明显变化, 在 4~8 h 内转录水平较对照明显升高, 而在随后的 4 h 内 (8~12 h), 转录水平迅速下降. 在

12~72 h 低温胁迫过程中, 尽管 *atpA* 基因转录水平略有波动, 但明显受到低温抑制. 另外, 在解除低温胁迫 8 h 内 (72~80 h), *atpA* 基因转录水平略有回升, 在随后的 8 h (80~88 h) 内, 转录水平快速回升, 且远远超过了对照, 持续一定时间后渐渐恢复至处理前水平 (88~112 h) (图 7).



**Fig.7 Expression levels of the *atpA* cDNA fragment in the control and treatment by Northern blot**

0~72 h: treatment by chilling at 2°C; 72~112 h: culture at 25°C after chilling-stress at 2°C; C: control; T: treatment; 1~13: 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 80, 100, 112 h; Open bar and solid bar stand for control and treatment.

### 3 讨 论

植物低温胁迫实质上是感受低温信号、调节基因表达和代谢的环境适应过程。植物处于低温逆境时，机体内除了被动地发生一系列生理衰减反应以外，也会主动进行耐受(或抵御)性反应，进而对低温做出快速应答。在基因转录水平对低温胁迫做出应答是植物适应性反应的重要环节。水稻幼苗受低温胁迫时，*atpH* 基因(编码叶绿体 ATPase CF<sub>0</sub> 的 III 亚基)的转录在 8°C 处理 1 天就明显下降，2 天后完全受抑制<sup>[23]</sup>，在本研究中，2°C 低温胁迫处理 12 h，ATPase α 亚基基因转录会受到明显抑制，说明低温胁迫会对参与构成 ATPase 亚基基因转录水平产生深刻影响。川草 2 号老芒麦在受到低温胁迫时 *atpA* 基因转录受到影响，可能会在两个方面对植物的耐逆反应产生作用，一是会影响到 ATPase 活性，二是会影响到细胞信号转导。

低温胁迫引起酶分子数量减少、酶分子构象发生变化、或使膜上或膜质中 Ca<sup>2+</sup> 浓度发生变化

等均可导致酶活性的变化。越来越多的研究结论证实，作为能量代谢关键酶的 ATPase 与低温胁迫有着直接或间接的关系。水稻幼苗经过 1°C 处理 2 天后质膜 ATPase 活性明显降低<sup>[20]</sup>，在对小麦<sup>[21]</sup>、水稻幼苗<sup>[22]</sup>等的研究中也得出了相同或类似的结论。ATPase 活性的变化也与植物自身的耐寒性有关，耐寒水稻幼苗受到低温胁迫初期(2 天)，ATPase 活性明显升高，而不耐寒品种却明显下降<sup>[3]</sup>。川草 2 号老芒麦抗寒性强，在受到低温胁迫时，其 *atpA* 基因转录水平的变化与耐寒水稻 ATPase 活性变化有着一定的一致性，而 ATPase 活性增强对植物抵御逆境具有积极适应意义<sup>[24,25]</sup>。

植物从感受低温信号到发生一系列生理生化反应和调节基因表达，进而产生抗寒能力存在一个复杂的信号网络系统。目前关于 ATPase α 亚基与植物信号转导相关性的研究未见报道，在动物体内，ATPase α 亚基作为 P2Y 受体的配基<sup>[18]</sup>，在 G 蛋白的跨膜信号转导中发挥着重要作用。在植物的信号转导过程中 G 蛋白参与调节叶绿体类囊体膜上蛋白激酶和核蛋白的磷酸化过程<sup>[26,27]</sup>，而蛋白激酶和

蛋白磷酸化酶参与低温信号转导过程<sup>[28-31]</sup>, 在 *atpA* 基因的序列分析中发现, ATPase  $\alpha$  亚基存在多处蛋白激酶和酪蛋白激酶磷酸化位点, 由此可以推测 ATPase  $\alpha$  亚基作为酶蛋白受体参与细胞低温信号转导过程. 本实验中, 在温度剧烈变化时, *atpA* 基因转录水平基本维持原状, 而在随后转录水平明显增加, 说明  $\alpha$  亚基在植物对温度信号的转导中可能充当着次级信使的作用.

另外, 我们注意到对多亚基构成的酶蛋白而言, 在对环境变化做出反应时, 其各个组成亚基在蛋白质水平上的变化并不是同步的<sup>[32]</sup>, 而且在诱导基因转录后调节蛋白质的翻译、加工则更为复杂, 具有更为精细的内在调控机制<sup>[33]</sup>. 因此欲揭示低温胁迫时 *atpA* 基因的转录丰度变化, 以及如何影响和调控 ATPase 活性和低温信号转导, 还需要深入研究.

### 参 考 文 献

- Boyer P D. The ATP synthase a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66** (6): 717~749
- 倪张林, 魏家绵. ATP 合酶的结构与催化机理. *植物生理与分子生物学报*, 2003, **29** (5): 367~374  
Ni Z L, Wei J M. *J Plant Physiol Molecular Biol*, 2003, **29** (5): 367~374
- 陈亚华, 沈振国, 刘友良. 低温、高 pH 胁迫对水稻幼苗根系质膜、液泡膜 ATP 酶活性的影响. *植物生理学报*, 2000, **26** (5): 407~412  
Chen Y H, Shen Z G, Liu Y L. *Acta Phytophysiol Sin*, 2000, **26** (5): 407~412
- Arora R, Palta J P. A loss in plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze thaw injury and post thaw recovery in onion bulb scale tissue. *Plant Physiol*, 1991, **95** (5): 846~852
- Yoshiday S. Low temperature-induced cytoplasmic acidosis in cultured mung bean (*Vigna radiata* (L) Wilczek) cells. *Plant Physiol*, 1994, **104** (6): 1131~1138
- 石晓冰, 魏家绵, 沈允钢. 用酵母双杂交系统检测菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF<sub>1</sub> 各亚基间的相互作用. *中国科学(C 辑)*, 2000, **30** (3): 276~281  
Shi X B, W J M, Shen Y G. *Sci China (Series C)*, 2000, **30** (3): 276~281
- Cruz J A, Harfe B, Badkowski C A, *et al.* Molecular dissection of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase of spinach. *Plant Physiol*, 1995, **109** (4): 1379~1388
- Bottina B, Graber P. The structure of the H<sup>+</sup>-ATP synthase from chloroplast and its subcomplexes as revealed by electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1458** (3): 404~416
- Tucker W C, Du Z, Hein R, *et al.* Role of the ATP synthase  $\alpha$  subunit in conferring sensitivity to tentoxin. *Biochemistry*, 2001, **40** (25): 7542~7548
- Tucker W C, Du Z, Hein R, *et al.* Hybrid Rhodospirillum rubrum F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthases containing spinach chloroplast F<sub>1</sub> $\beta$  or  $\alpha$  and  $\beta$  subunits reveal the essential role of the  $\alpha$  subunit in ATP synthesis and tentoxin sensitivity. *J Biol Chem*, 2000, **275** (2): 906~912
- Schnick C, Kortgen N, Groth G. Complete inhibition of the tentoxin-resistant F<sub>1</sub>-ATPase from *Escherichia coli* by the phytopathogenic inhibitor tentoxin after substitution of critical residues in the  $\alpha$  and  $\beta$  subunit. *J Biol Chem*, 2002, **277** (52): 51003~51007
- Groth G, Mills D A, Christiansen E, *et al.* Characterization of a phosphate binding domain on the  $\alpha$  subunit of chloroplast ATP synthase using the photoaffinity phosphate analogue 4-azido-2-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry*, 2000, **39** (45): 13781~13787
- Jacobsen M D, Pedersen P A, Jorgensen P L. Importance of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase residue  $\alpha$  Arg<sup>544</sup> in the segment Arg<sup>544</sup>~Asp<sup>567</sup> for high affinity binding of ATP, ADP of Mg<sup>2+</sup>-ATP. *Biochemistry*, 2002, **42** (5): 1451~1456
- Coppi M V, Compton L A, Guidotti G. Isoform-specific effects of charged residues at borders of the M1-M2 loop of the Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit. *Biochemistry*, 1999, **38** (8): 2494~2505
- Legate L R, Falcone D, Andrews D W. Nucleotide dependent binding of the GTPase domain of the signal recognition particle receptor  $\beta$ -subunit to the  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem*, 2000, **275** (35): 27439~27446
- Koenderink J B, Swaris H G P, Hermsen H P H, *et al.*  $\beta$ -subunits of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase have a high preference for their own  $\alpha$  subunit and affect the K<sup>+</sup> affinity of these enzymes. *J Biol Chem*, 1999, **274** (17): 11604~11610
- Smolka A J, Larsen K A, Schweinfest C W, *et al.* H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit C terminal membrane topology: Epitope tags in the insect cell expression system. *Biochem J*, 1999, **340** (3): 601~611
- Schäfer R, Reiser G. ATP  $\alpha$  Subunit is a ligand for P2Y receptors in synaptosomal membranes: solubilization of [<sup>35</sup>S] ATP  $\alpha$  subunit binding proteins associated with G-proteins. *Neurochemistry International*, 1999, **34**: 303~317
- Huettner J E. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neuro*, 2003, **70**: 387~407
- 王红, 简令成, 张举仁. 低温逆境中水稻幼苗膜 ATP 酶和 5'-核苷酸酶活性的变化. *电子显微学报*, 1994, **13** (3): 190~195  
Wang H, Jian L C, Zang J R. *J Chin Electron Microscopy Society*, 1994, **13** (3): 190~195
- 王红, 孙德兰, 简令成. 小麦幼苗质膜 Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性与低温损伤及恢复的关系. *电子显微学报*, 1999, **18** (2): 157~164  
Wang H, Sun D, Jian L C. *J Chin Electron Microscopy Society*, 1999, **18** (2): 157~164
- 赵利辉, 刘友良. 冷胁迫对水稻幼苗根系液泡膜质子泵的伤害及钙的调节作用. *南京农业大学学报*, 2000, **23** (3): 5~8  
Zhao L H, Liu Y L. *J Nanjing Agricul Uni*, 2000, **23** (3): 5~8
- Mao X X, Zhuang C X, Peng X X. AtpH is a chilling repressed gene in rice. *Acta Botan Sin*, 2003, **45** (4): 484~487
- 夏朝晖, 李晓薇, 余和芬, 等. 盐和干旱胁迫对燕子掌叶片液泡膜

- H<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响. 植物生理学报, 2000, **26** (5): 433~436  
Xia Z H, Li X W, Yu H F, *et al.* Acta Phytophysiol Sin, 2000, **26** (5) : 433~436
- 25 Rose B G., Erin L P, Jennie L, *et al.* ATP sensitive K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle from cold acclimated goldfish: characterization and altered response to ATP. Comp Biochem Physiol, **119** (1): 395~401
- 26 Millner P A. Are guanine nucleotide-binding proteins involved in regulation of thylakoid protein kinase activity?. FEBS Lett, 1987, **226**:155~160
- 27 Romero L C, Biswal B, Song P S. Protein phosphorylation in isolated nuclei from etiolated *Avena* seedlings: Effects of red/farred light and cholera toxin. FEBS Lett, 1991, **282**: 347~350
- 28 Monroy A F, Castonguay Y, Laberge S, *et al.* A new cold-induced Alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. Plant Physiol, 1993, **102**: 873~879
- 29 Monroy A F, Sangwan V, Dhindsa R S. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. Plant J, 1998, **13**: 653~660.
- 30 Suzuki I, Los D A, Kanesaki Y. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. EMBO J, 2000, **19** (6): 1327~1334
- 31 Martin A F, Busconi L, A rice membrane-bound Calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. Plant Physiol, 2001, **125**: 1442~1449
- 32 Lüttge U. Plant cell membranes and salinity: structural, biochemical and biophysical changes. R Bras Fisiol Veg, 1993, **5** (2): 217~224
- 33 陈香波, 张爱平, 姚泉洪. 植物抗寒基因工程研究进展. 生物技术通讯, 2001, **12**(4): 318~323  
Chen X B, Zhang A P, Yao Q H. Research advances on gene engineering of plant for cold resistance. Lett Biotech, 2001, **12** (4): 318~323

## Molecular Cloning Regulation of Chilling-repressed Gene *atpA* in *Elumus sibiricus* \*

HE Wen-Xing, XU Ying, TANG Lin, WEI Qin, LI Jing, CHEN Fang\*\*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract** ATPase is closely related to chilling tolerance. The EST sequence of chilling-repressed gene *atpA* encoding CF<sub>1</sub> α-subunit was obtained from *Elumus sibiricus* L. cv.'chuancao No.2' by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) differential display. Full-length cDNA of 1 754 bp was cloned by 5' RACE. The *atpA* has an open reading frame (ORF) of 1 518 bp that encodes a precursor protein of 505 amino acid residues. The deduced amino acid sequence exhibits 95%, 94% and 94% positional identity with *atpA* of wheat, rice and corn, respectively. Northern hybridization analysis on mRNA from treatment at 2°C and post-treatment, in total of 13 time stages, showed that its RNA transcript was strongly inhibited after 12 h of chilling stress, whereas it was clearly higher than control during 4~8 h of chilling stress and 16~24 h after removing stress. This result provides new clue for revealing the CF<sub>1</sub> α-subunit role to ATPase in plant defence against chilling stress.

**Key words** *atpA* gene, DDRT-PCR, chilling stress, *Elumus sibiricus* L cv.'chuancao No. 2'

\*This work was supported by The National Key Sciences and Technologies R&D Program in the 10th Five-year Plan of China(2001BA606A-11).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-28-85417281, E-mail: cfang@263.net

Received: August 10, 2004 Accepted: September 28, 2004