

研究报告

Research Report

大豆细胞质雄性不育系及其保持系线粒体基因的 RNA 编辑位点研究

刘海军^{1,2}, 赵丽梅², 董英山², 石瑛¹, 张春宝²

1 东北农业大学农学院, 哈尔滨, 150030

2 吉林省农业科学院大豆研究所, 长春, 130033

✉ 通讯作者: cbzhang@126.com; yshi@neau.edu.cn; ☒ 作者

豆科基因组学与遗传学, 2014 年, 第 5 卷, 第 3 篇 doi: 10.5376/lgg.cn.2014.05.0003

收稿日期: 2014 年 06 月 01 日

接受日期: 2014 年 06 月 01 日

发表日期: 2014 年 06 月 01 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2014 年第 12 卷第 4 期 694-700 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播

引用格式(中文):

刘海军等, 2014, 大豆细胞质雄性不育系及其保持系线粒体基因的 RNA 编辑位点研究, 豆科基因组学与遗传学(online), 5(3): 10-17 (doi: 10.5376/lgg.cn.2014.05.0003)

引用格式(英文):

Liu et al., 2014, RNA Editing Analysis of Mitochondrial Gene in Cytoplasmic Male Sterile Line and Maintainer Line in Soybean, Douke Jiyinzuxue Yu Yichuanxue (online) (Legume Genomics and Genetics), 5(3): 10-17 (doi: 10.5376/lgg.cn.2014.05.0003)

摘要 RNA 编辑可引起线粒体相关基因的碱基发生插入、缺失或替换, 进而影响初始转录物的剪接和加工, 形成细胞质雄性不育(CMS)。本研究以大豆 RN 型 CMS 不育 JLCMS9A 及其对应的保持系 JLCMS9B 为材料, 比较分析了大豆线粒体基因 *atp1*、*atp6*、*atp9*、*coxII*、*coxIII* 和 *cob* 的编辑位点与 CMS 的关系。结果表明, 在 JLCMS9A 和 JLCMS9B 中 *coxII* 未发生 RNA 编辑; *atp1*、*atp9*、*coxIII* 和 *cob* 基因发生的 RNA 编辑与 CMS 无关; 而 *atp6* 基因在 JLCMS9A 中比 JLCMS9B 多 3 个编辑位点, 其中 2 个位点导致了氨基酸变化, 并使得预测的蛋白结构发生变化。因此, 推测这种改变很可能引起 JLCMS9A 中 *atp6* 基因的正常功能受到影响, 而形成 CMS。

关键词 大豆; 细胞质雄性不育; 线粒体; RNA 编辑

RNA Editing Analysis of Mitochondrial Gene in Cytoplasmic Male Sterile Line and Maintainer Line in Soybean

Liu Haijun^{1,2}, Zhao Limei², Dong Yingshan², Shi Ying¹, Zhang Chunbao²

1 College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030

2 Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130033

✉ Corresponding author, cbzhang@126.com; yshi@neau.edu.cn; ☒ Authors

Abstract RNA editing can cause mutations in mitochondrial genes including nucleotide insertion, deletion or substitution, which affects the splicing of the primary transcripts, resulting in cytoplasmic male sterility (CMS). In order to better understand the relationship between RNA editing and CMS, RNA editing comparative analysis were performed to study the mitochondrial genes including *atp1*, *atp6*, *atp9*, *coxII*, *coxIII* and *cob* in soybean RN type CMS line JLCMS9A and its maintainer line JLCMS9B. The results showed that, *coxII* is not the cause for CMS since RNA editing doesn't occur between JLCMS9A and JLCMS9B; neither is *atp1*, *atp9*, *coxIII* or *cob* gene since RNA editing in these genes are not related to CMS. However, *atp6* gene has three more editing sites in JLCMS9A than JLCMS9B, two of which caused changes in amino acid and prediction of protein structure. These results suggested that this change is most likely to cause the abnormal function of *atp6* gene in JLCMS9A and lead to CMS.

Keywords Soybean, Cytoplasmic male sterile, Mitochondrial, RNA Editing

RNA 编辑(RNA editing)是一种通过核苷酸的插入、缺失或碱基修饰,使得转录表达的氨基酸编码序列不同于基因组序列现象,它可以在几乎所有的植物线粒体中被检测出来,是 RNA 成熟化的表现以及线粒体基因产生功能蛋白的必备环节,同时还是细胞核调控线粒体基因表达的关键方式(Gray et al., 1992; Malek et al., 1996; Brennicke et al., 1999)。细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterile, CMS)是由细胞质基因和核基因互作控制的不育,是生产杂交种的重要途径之一。研究表明, CMS 与高等植物中线粒体的 RNA 编辑有重要关系,主要是由于 RNA 编辑,导致线粒体相关基因的碱基发生插入、缺失或替换,进而影响初始转录物的剪接和加工,导致了基因结构或表达调控模式发生改变,或者形成嵌合基因等,这些非正常或不充分的编辑产物可能会导致线粒体功能的非正常发挥而形成 CMS (Stahl et al., 1994)。

Howad 和 Kempken (1997)对高粱线粒体的 *atp6*、*atp9*、*nad3*、*nad4* 和 *rps12* 基因的研究中发现,其雄性不育产生的原因可能是 *atp6* 基因发生了 RNA 编辑。Rurek 等(2001)对胡萝卜不育系和保持系的 *nad3* 基因进行了 RNA 编辑研究,发现不育系与保持系相比,有 3 处碱基发生了 C-U 转换,可能引起 CMS。孔进等(2006)以红莲型水稻细胞质雄性不育系粤泰 A 和保持系粤泰 B 及杂种红莲优 6 为材料,研究了 *atp6*、*cox II* 及嵌合基因 *aorfH79* 的 RNA 编辑位点,结果表明, *atp6* 基因的 RNA 编辑能力受恢复基因的影响。*cox II* 基因在 3 个材料中 RNA 编辑状态没有变化,而嵌合基因 *aorfH79* 在各个材料中均不被编辑,推测红莲型水稻细胞质雄性不育与 *atp6* 基因 RNA 编辑能力的丧失紧密相关。Yang 等(2007)对芥菜 *atp9* 基因的 RNA 编辑进行了研究,发现不育系 *atp9* 基因与正常可育材料间发生了 4 处碱基变化,其中 3 处为 C-U 的变化,一处为 U-C 改变,推测其可能导致 *atp9* 蛋白的疏水性降低,还可进一步推测 RNA 编辑所产生的特定的线粒体基因的功能障碍,很可能是导致 CMS 的一个因素。Wei 等(2008)对紫稻细胞质雄性不育系樱香 A 及其保持系樱香 B 的 *atp6* 基因转录本 cDNA 序列进行分析发现,樱香 A 中没有发生 RNA 编辑,而樱香 B 的 *atp6* 基因 cDNA 序列

中有 16 个编辑位点,位于 15 个密码子中,所编码的氨基酸均发生改变,尤其是在 1003 位点由 C 替换为 T,导致原来编码谷氨酰胺密码子(CAA)成为终止密码子(TAA),保证了 *atp6* mRNA 编码一个正常的多肽。然而,在不育系 *atp6* 基因由于没有发生 RNA 编辑,导致其缺乏终止密码子而不能形成正常的多肽,因此认为其可能与 CMS 相关。Wang 等(2009)对同核异质和同质异核玉米材料的 *atp6* 和 *cox II* 基因的 RNA 编辑进行了研究,发现两个基因均存在大量 RNA 编辑位点,并认为这两个基因的 RNA 编辑可能与雄性不育有关。

中国是世界上最早利用细胞质雄性不育生产大豆杂交种的国家(Sun et al., 1994; 赵丽梅等, 2004)。目前已利用 RN 型 CMS “三系”选育春大豆杂交种 8 个;利用 ZD 型 CMS “三系”选育了夏大豆杂交种 3 个,在大豆杂种优势利用方面处于世界领先地位,然而我们在 CMS 机理研究方面的报道较少。由于有大量研究表明 CMS 与 RNA 编辑有关,韩利涛等(2010)对大豆 N8855 型 CMS 不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的 *atp6* 基因的 RNA 编辑进行了分析,发现在不育系与保持系的 *atp6-3* 基因保守区中均发现 2 个互不相同且编码不同氨基酸的编辑位点。Jiang 等(2013)采用同样方法对 NJCMS2A 与 NJCMS2B 的 *atp9* 基因进行了比较分析,发现在 cDNA 水平上不育系和保持系之间发生了两次 C-U 转换,导致二者编码蛋白不同,但是否其是导致所用不育系产生 CMS 的原因,并未加以证实。

本研究以吉林省农业科学院选育的大豆 RN 型 CMS 不育系 JLCMS9A 和保持系 JLCMS9B 为材料,对已在其它植物中发现的与 CMS 有关的 6 个线粒体基因 *atp1*、*atp6*、*atp9*、*cox II*、*cox III* 和 *cob* 进行 RNA 编辑位点研究。希望通过分析大豆 CMS 不育系和保持系中这些基因在转录水平和基因组水平的差异,探讨它们是否与 RN 型细胞质雄性不育有关。

1 结果与分析

1.1 目的基因的扩增

首先以大豆内参基因 Actin11 片段引物(F:

5'-GGGCATTGGAATTTGTTTCG-3'; R: 5'-GAAGTTATTTGAAGGACCG-3'), 对 JLCMS9A 和 JLCMS9B 的 cDNA 第一链进行检测, 确定其中是否含有 DNA 污染。该片段含有 330 bp 内含子序列的, 通过电泳检测发现, cDNA 扩增片段长度为 390 bp 左右, DNA 扩增片段长度为 720 bp 左右, 与预计片段长度相符, 证实 JLCMS9A 和 JLCMS9B 的 cDNA 中无 DNA 污染(图 1)。

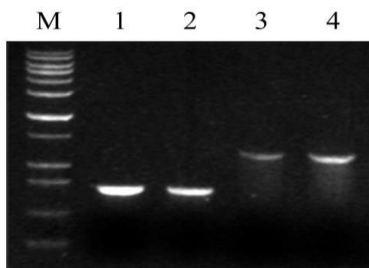


图 1 不育系和保持系 cDNA 第一链纯度检测图

注: M: 1 kb DNA ladder marker; 1: JLCMS9A cDNA; 2: JLCMS9B cDNA; 3: JLCMS9A DNA; 4: JLCMS9B DNA

Figure 1 Purity test of cDNA first strand in CMS and maintainer line

Note: M: 1 kb DNA ladder marker; 1: JLCMS9A cDNA; 2: JLCMS9B cDNA; 3: JLCMS9A DNA; 4: JLCMS9B DNA

然后分别以不育系 JLCMS9A 与其保持系 JLCMS9B 的 mtDNA 和无 DNA 污染的 cDNA 为模板, 对 *atp1*、*atp6*、*atp9*、*cox II*、*cox III* 和 *cob* 基因进行 PCR 扩增, 扩增产物电泳结果如图 2 所示, 所有目的基因中均能扩增出与预计片段大小一致的条带, 而且基因组水平和转录水平扩增出的片段长度基本相同。另外, 本研究还进行了 2 次重复 PCR 扩增, 3 次 PCR 产物测序结果完全一致, 确

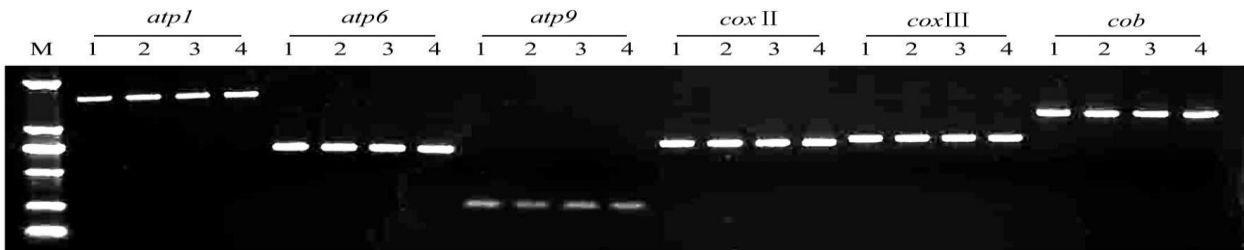


图 2 不育系和保持系的 *atp1*、*atp6*、*atp9*、*cox II*、*cox III* 和 *cob* 基因扩增结果

注: 1: JLCMS9A 的 mtDNA 扩增结果; 2: JLCMS9B 的 mtDNA 扩增结果; 3: JLCMS9A 的 cDNA 扩增结果; 4: JLCMS9B 的 cDNA 扩增结果

Figure 2 Amplification results of *atp1*、*atp6*、*atp9*、*cox II*、*cox III* and *cob* genes in CMS and maintainer line

Note: 1: The amplification results of mtDNA of JLCMS9A; 2: The amplification results of mtDNA of JLCMS9B; 3: The amplification results of cDNA of JLCMS9A; 4: The amplification results of cDNA of JLCMS9B

保了扩增序列的准确性。进一步比对基因组水平和转录水平扩增序列的测序结果证实, 这 6 个基因均无内含子。

1.2 目的基因序列的 RNA 编辑分析

用 Vector NTI Suite 8.0 软件的 Align X 功能对所有基因的基因组序列和 cDNA 序列进行分析发现, 所有基因序列在基因组水平上都无差异; 在转录水平上, *atp1* 仅在 JLCMS9B 中发生了 RNA 编辑, 而 *atp6*、*atp9*、*cox III* 和 *cob* 这 4 个基因在 JLCMS9A 和 JLCMS9B 的 cDNA 序列中均发生了 RNA 编辑, 所有编辑均发生在密码子的第一或第二位点上, 且都是由 C-U 的转变(图 3), 而 *cox II* 基因在 JLCMS9A 和 JLCMS9B 中均未发生 RNA 编辑。

其中 *atp1* 基因虽然在 JLCMS9B 中特异性存在 RNA 编辑位点, 但其翻译的氨基酸序列与 JLCMS9A 翻译的氨基酸序列完全相同, 不存在蛋白功能变化, 因此可推断其与 CMS 无关。*atp9*、*cox III* 和 *cob* 这 3 个基因在不育系和保持系的 cDNA 序列中均发生了 C-U 的转变, 这其中 *cox III* 基因发生 RNA 编辑的比率最高, 达到了 1.38%, 而 *cob* 为 1.19%, *atp9* 为 0.89% (表 1)。虽然上述 3 个基因均在 JLCMS9A 和 JLCMS9B 中发生了不同比率的 RNA 编辑, 但这些基因在两份材料中发生编辑的位点一致, 最终编码氨基酸也完全相同, 因此与 *atp1* 基因一样, 它们在转录水平发生的 C-U 转换与 CMS 不存在直接关系。

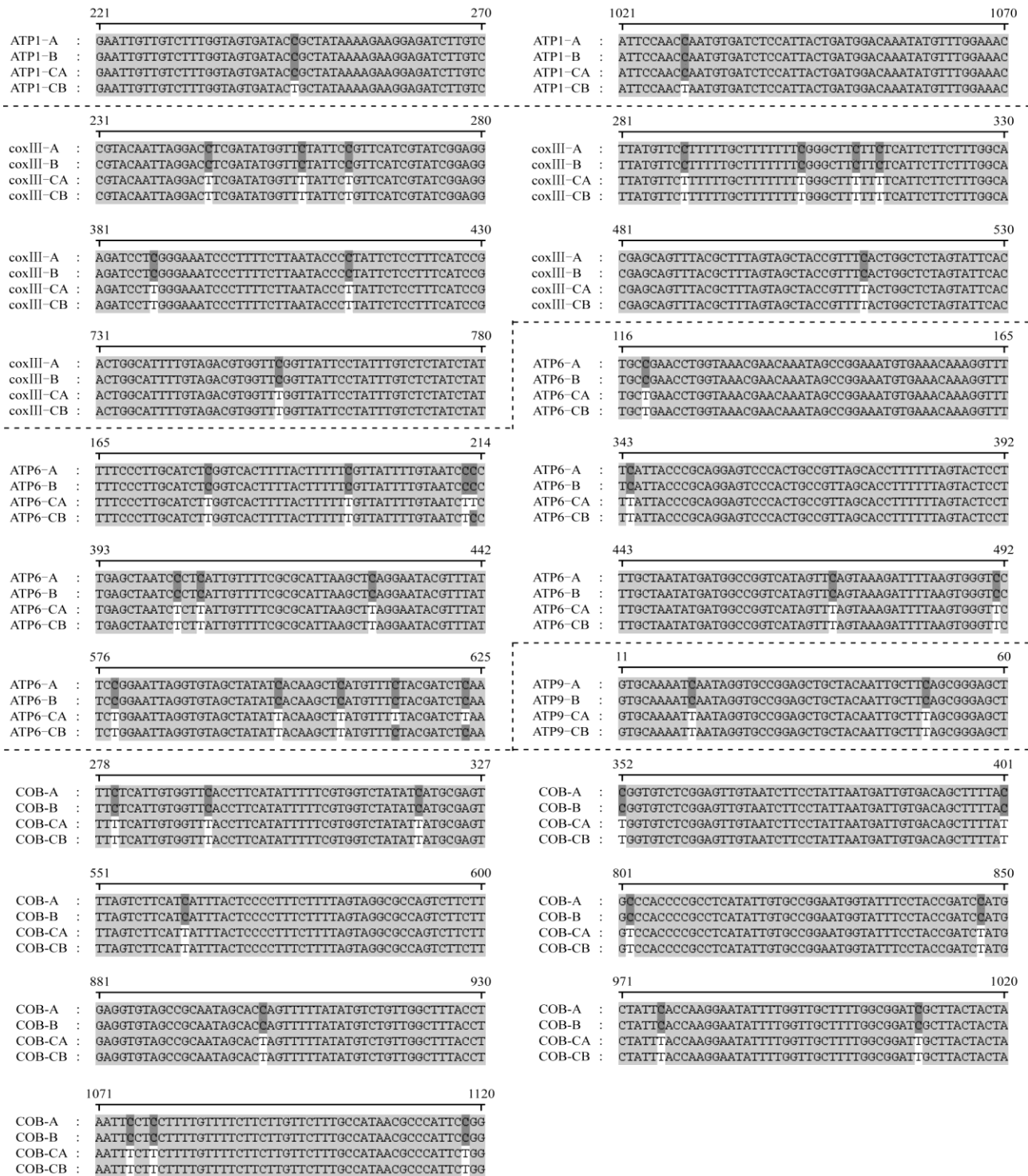


图3 大豆 *atp1*, *atp6*, *atp9*, *coxIII* 和 *cob* 基因的核苷酸序列及RNA 编辑位点

注: A 和 B 为不育系和保持系线粒体 DNA 序列; CA 和 CB 为不育系和保持系 cDNA 序列; 灰色和深灰色背景为一致性序列, 白色背景为 RNA 编辑位点

Figure 3 The nucleotide sequence and RNA editing sites of *atp1*, *atp6*, *atp9*, *coxIII* and *cob* in soybean

Note: A and B are mtDNA sequences of CMS and maintainer line; CA and CB are cDNA sequences of CMS and maintainer line; Consensus sequences are in gray and dark gray background, RNA editing sites are in white background

表 1 不育系和保持系中各基因 RNA 编辑发生比率

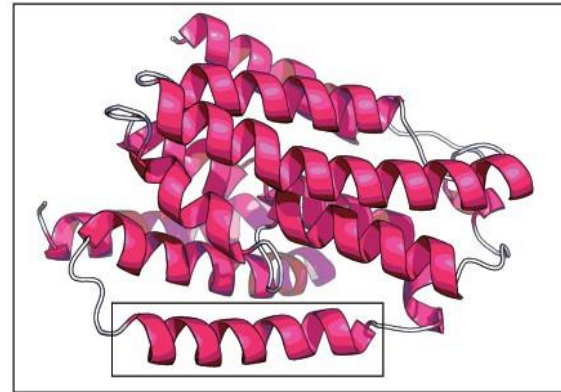
Table 1 RNA editing occurrence ratio of each gene between CMS and maintainer line

基因	不育系(%)	保持系(%)
Gene	CMS line (%)	Maintainer line (%)
<i>atp1</i>	0.00	0.13
<i>atp6</i>	2.23	1.79
<i>atp9</i>	0.89	0.89
<i>cox II</i>	0.00	0.00
<i>cox III</i>	1.38	1.38
<i>cob</i>	1.19	1.19

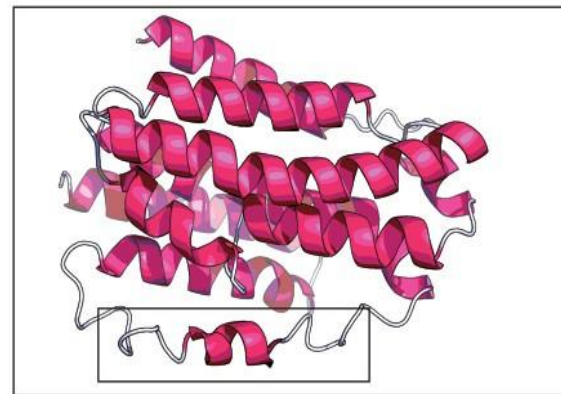
然而 *atp6* 基因存在特殊情况, 其在 JLCMS9A 的 cDNA 序列中存在 15 个 RNA 编辑位点, 而在 JLCMS9B 中只有 12 个。二者的 RNA 编辑位点均为 C-U 的转换, JLCMS9B 的 12 个 RNA 编辑位点均在 JLCMS9A 中存在, 但 JLCMS9A 却独有另外 3 个 RNA 编辑位点。这 3 个特异位点分别发生在 JLCMS9A 的 *atp6* cDNA 序列的第 213 bp、614 bp 和 623 bp 处, 其中第 213 bp 处的 C-U 转换为亮氨酸(L)同义转换, 而第 614 bp 和 623 bp 处分别发生丝氨酸(S)- 苯丙氨酸(F)和丝氨酸(S)- 亮氨酸(L)转换(图 4), 这样就引起氨基酸类型的变化, 使得 JLCMS9A 和 JLCMS9B 二者编码蛋白完全不同, 导致二者的 *atp6* 基因功能有可能发生改变。

进一步利用 RaptorX 在线服务器进行蛋白质结构预测发现, JLCMS9A 的 *atp6* 蛋白在图 5 标注区域有 5 个 α 螺旋, 而 JLCMS9B 却只有 2 个, 可见这 2 个氨基酸的差异引起 *atp6* 蛋白结构的变化。由于 JLCMS9B 是可育的保持系, 而 JLCMS9A 是细胞质雄性不育系, 因此可推断 JLCMS9A 中 *atp6*

基因编码蛋白的改变, 导致了蛋白结构的变化, 这可能会引起 *atp6* 基因不能正常行使功能。



A



B

图 5 不育系和保持系 *atp6* 蛋白结构预测图

注: A: JLCMS9A; B: JLCMS9B; 黑色方框标注为二者差异结构

Figure 5 The protein structure prediction of *atp6* between CMS and maintainer line

Note: A: JLCMS9A; B: JLCMS9B; Black box marked differences structure between A and B

```

ATP6-PA : MLLTFSLVLLLFHFVTKNGGGKLVPNAWQSLVELIYDFVNLNVNEQIAGNVKQRFPPCILVTFITFLFCN[ ]QGMI : 75
ATP6-PB : MLLTFSLVLLLFHFVTKNGGGKLVPNAWQSLVELIYDFVNLNVNEQIAGNVKQRFPPCILVTFITFLFCN[ ]QGMI : 75

ATP6-PA : PYSFTVTSHFLITLGLSFSIFIGITIVGFQQRNGLHFLSFLLPAGVPLPLAPFLVLELISYCFRALSGLGIRLFAN : 150
ATP6-PB : PYSFTVTSHFLITLGLSFSIFIGITIVGFQQRNGLHFLSFLLPAGVPLPLAPFLVLELISYCFRALSGLGIRLFAN : 150

ATP6-PA : MMAGHSLVKILSGFAWTMLCMNDLFYFIFGDLGPLFIVLALTGLELGVAILQAYV[ ]T[ ]L[ ]C[ ]I[ ]Y[ ]L[ ]N[ ]D[ ]A[ ]I[ ]N[ ]L[ ]H[ ]Q[ ]T[ ]G : 224
ATP6-PB : MMAGHSLVKILSGFAWTMLCMNDLFYFIFGDLGPLFIVLALTGLELGVAILQAYV[ ]S[ ]T[ ]S[ ]C[ ]I[ ]Y[ ]L[ ]N[ ]D[ ]A[ ]I[ ]N[ ]L[ ]H[ ]Q[ ]T[ ]G : 224
    
```

图4 不育系和保持系 $atp6$ 编码氨基酸序列比较

注: PA: JLCMS9A; PB: JLCMS9B; 黑色方框是一致氨基酸, 虚线方框是差异氨基酸

Figure 4 Alignment of amino acids sequences of *atp6* between CMS and maintainer line

Note: CA and CB are JLCMS9A and JLCMS9B; Black box is the same amino acid, dotted box are the difference amino acid

2 讨论

线粒体中与能量代谢相关的功能基因的 RNA 编辑, 是其产生功能蛋白的重要步骤。但一些非正常的编辑将导致了基因结构或表达调控模式发生改变, 进而影响相应功能, 造成线粒体能量代谢紊乱。通过本研究发现在大豆 RN 型 CMS 不育系和保持系中, *atp1*、*atp9*、*coxII*、*coxIII*和 *cob* 这些控制线粒体能量代谢的基因的编码蛋白之间没有任何差别, 可见这 5 个基因的 RNA 编辑均不是引起 RN 型细胞质雄性不育的相关因子。但由于 RNA 编辑仅仅是产生 CMS 的一个因素, 已知报导的大多数 CMS 都是线粒体相关基因起始密码子前端或终止子后端出现插入、缺失或突变而产生新的 ORF, 引起相关基因功能紊乱造成的, 因此我们也不能排除大豆 RN 型 CMS 存在这种可能。本研究中, *atp6* 基因在 JLCMS9A 和 JLCMS9B 中发生 RNA 编辑的翻译的氨基酸序列并不相同, 并且其与其他几个基因相比无论是 JLCMS9A 和 JLCMS9B, 发生 RNA 编辑的比率是最高的, 其中 JLCMS9A 达到了 2.23%, 而 JLCMS9B 也有 1.79%(表 2)。JLCMS9A 独有的 3 个编辑位点, 其中 2 个引起氨基酸的改变, 分别是由丝氨酸- 苯丙氨酸和丝氨酸- 亮氨酸的转变。两个经过 RNA 编辑的位点均由丝氨酸转换, 而丝氨酸为亲水性氨基酸, 而转换成的苯丙氨酸和亮氨酸均为疏水性氨基酸, 这在一定程度上增加了 *atp6* 编码蛋白质的疏水性。通过蛋白质结构预测还发现二者在结构上也存在明显差异, 这种结

构差异有可能会造不育系 *atp6* 蛋白不能正常行使功能。

韩利涛等(2010)证实在 N8855 型 CMS 不育系与保持系的 *atp6* 基因保守区有 2 个能引起氨基酸编码变化的 RNA 编辑位点, 并认为可能与 CMS 有关。而本研究发现 *atp6* 基因在 RN 型 CMS 不育系中同样存在特异性 RNA 编辑, 与保持系相比, 不育系多了 3 个 RNA 编辑位点, 这其中 2 个位点导致其与保持系编码氨基酸存在差异, 这与 N8855 细胞质得到的差异氨基酸数目相同, 但二者发生变异的氨基酸位点位置却完全不同, 而且 N8855 和 RN 细胞质 *atp6* 基因 RNA 编辑比率存在显著差异, RN 细胞质显著高于 N8855 细胞质。

以上分析表明, 不同类型的细胞质的线粒体内某些未知因素可能参与了 *atp6* 基因的 RNA 编辑, 而 *atp6* 是线粒体呼吸代谢过程中重要的复合酶亚基基因, 其参与线粒体对花器官的能量供应, 若 *atp6* 基因不能正常转录, 将导致使线粒体供能不足, 最终导致花粉败育。因此, 可以推测不育系 *atp6* 基因发生的特异性 RNA 编辑很可能是引起大豆 CMS 的原因, 但仍需进一步通过将不育系发生 RNA 编辑的 *atp6* 基因转入拟南芥和百脉根等模式植物或直接转入大豆, 通过在开花期进行花粉育性分析, 以证实推测的正确性。

表2 本研究所用基因及其引物序列

Table 2 Genes and primer sequences in this study

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
Gene	Forward premier (5'-3')	Reverse premier (5'-3')
<i>atp1</i>	ATGGAATCTCTGTAAAGAGC	TCATATATAGTAAGTTCCAC
<i>atp6</i>	ATGCTGCTCACTCTCAGTTT	CTATCCAGTTTGATGGAGAT
<i>atp9</i>	ATGTTAGAAGGTGCAAATC	TTAGAAAACAAAGAGAATC
<i>coxII</i>	ATGGATCAAGTCATCCCTAC	TTAGTTGACTTGACTGGAA
<i>coxIII</i>	ATGATTGAATCTCAGAGGCA	TCATATACCTCCCCACCAAT
<i>cob</i>	ATGAGGAACCAACGATTCTC	TCACTGATCAGTCTCATCCG

3 材料与方

3.1 材料

3.1.1 植物材料

供试大豆 RN 型细胞质雄性不育系 JLCMS9A 及其对应保持系 JLCMS9B 为本实验室保存。将不育系和保持系种子分别用发芽纸卷好, 置于盛有 1/3

体积水的 500 mL 烧杯中, 30℃培养箱暗培养 7 d 后, 各取黄化苗 10 g, 利用差速及密度梯度离心法(费晓艳, 2011)提取大豆线粒体基因组 DNA。在吉林省农业科学院范家屯杂交大豆实验基地取开花期的不育系和保持系花苞为材料, 利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

3.1.2 试剂

Prime Script™ II cDNA 第一链合成试剂盒和 PrimeSTAR HS DNA 酶购自大连宝生物公司; 植物总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技公司; QuickGel Extraction 琼脂糖凝胶回收试剂盒和 Pure-Plasmid mini 质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物公司; pEASY-Blunt 亚克隆载体和 Trans-T1 感受态细胞购自北京全试金生物公司; 其余为国产分析纯试剂。

3.2 方法

3.2.1 PCR 与 RT-PCR

用 cDNA 第一链合成试剂盒将不育系和保持系总 RNA 合成 cDNA。根据 Genbank 公布的大豆 *atp1*、*atp6*、*atp9*、*cox II*、*cox III* 和 *cob* 基因 ORF 区设计引物, 引物序列见表 2, 均由北京华大基因合成。以此引物对提取的线粒体基因组 DNA 和合成的 cDNA 分别用 PrimeSTAR HS DNA 酶进行 PCR 扩增, 并重复 3 次, 分别取每次扩增产物进行下一步操作。

3.2.2 扩增片段的回收、克隆和鉴定

扩增得到的各基因 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测正确后切胶, 用琼脂糖凝胶试剂盒进行胶回收, 回收产物与 pEASY-Blunt 载体连接, 以 Trans-T1 大肠杆菌感受态细胞进行转化, 筛选阳性克隆, 将阳性重组子转入卡那霉素抗性 LB 培养基 37℃过夜培养, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 用目的基因引物和通用引物 M13 +/- 进行双重 PCR 检测。

3.2.3 测序与分析

每个基因经 3 次不同 PCR 扩增并鉴定正确的阳性克隆由天津华大基因测序。测序结果用 VectorNTI Suite 8.0 软件进行序列比对和分析; 利

用 RaptorX 在线服务器 (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>) 进行蛋白质结构预测。

作者贡献

刘海军是本研究的实验设计和研究的执行人, 并完成论文初稿的写作; 赵丽梅和董英山参与实验设计及论文修改; 石瑛参与实验设计及数据分析; 张春宝是项目的构思者及负责人, 参与实验设计、数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31201224)、吉林省科技发展计划项目(20130206004NY; 201201091)和国家高技术研究发展计划 863 计划重点项目(2011AA10A105)共同资助。感谢吉林省农业科学院提供实验材料和仪器设备支持。

参考文献

- Brennicke A., Felder A.M., and Binder S., 1999, RNA editing. *FEMSMicrobiology Reviews*, 23(3): 297-316
- Fei X. Y., 2011, Mitochondrial genome sequencing and analysis of cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in soybean, Thesis for M.S., Jilin University, Supervisor: Dong Y.S., pp.32-34 (费晓艳, 2011, 大豆细胞质雄性不育系及其配套保持系线粒体基因组的测序与分析, 硕士学位论文, 吉林大学, 导师: 董英山, pp.32-34)
- Gray M.W., Hanic-Joyce P.J., and Covello P.S., 1992, Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43(1): 145-175
- Han L.T., Yang S.P., Yu D.Y., and Gai J.Y., 2010, Comparative studies of RNA editing of *atp6* gene between cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 29 (3):361-365 (韩利涛, 杨守萍, 喻德跃, 盖钧镒, 2010, 细胞质雄性不育系与保持系 *atp6* 基因的 RNA 编辑比较研究, 大豆科学, 29(3): 361-365)
- Howad W., and Kempken F., 1997, Cell type-specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile Sorghum bicolor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(20): 11090-11095

- Jiang W., Yang S.P., Yu D.Y., and Gai J.Y., 2013, A comparative study of ATPase subunit 9 (*Atp9*) gene between cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in soybeans, *Afr. J. Biotechnol.*, 10(51): 10387-10392
- Kong J., Tan Y.P., Chen Z.Y., Li S.Q., and Zhu Y.G., 2006, Study on the editing sites in transcripts of functional genes of HL cytoplasmic male sterility rice mitochondria during microgametogenesis, *Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research)*, 24(2): 95-99 (孔进, 谭艳平, 陈祖玉, 李绍清, 朱英国, 2006, 水稻红莲型不育系雄性配子发育过程中线粒体功能基因转录本的编辑位点研究, *武汉植物学研究*, 24(2): 95-99)
- Malek O., Lattig K., Hiesel R., Brennicke A., and Knoop V., 1996, RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants, *EMBO J.*, 15(6): 1403-1411
- Rurek M., Szklarczyk M., Adamczyk N., Michalik B., and Augustyniak H., 2001, Differences in editing of mitochondrial *nad3* transcripts from CMS and fertile carrots, *Acta Biochim. Pol.*, 48(3): 711-717
- Stahl R., Sun S., L'Homme Y., Ketela T., and Brown G.G., 1994, RNA editing of transcripts of a chimeric mitochondrial gene associated with cytoplasmic male-sterility in *Brassica*, *Nucleic Acids Res.*, 22(11): 2109-2113
- Sun H., Zhao L.M., and Huang M., 1994, Studies on cytoplasmic-nuclear male sterile soybean, *Chinese Science Bulletin*, 39(2): 175-176
- Wang J., Cao M.J., Pan G.T., Lu Y.L., and Rong T.Z., 2009, RNA editing of mitochondrial functional genes *atp6* and *cox2* in maize (*Zea mays* L.), *Mitochondrion*, 9(5): 364-369
- Wei L., Yan Z.X., and Ding Y., 2008, Mitochondrial RNA editing of F0-ATPase subunit 9 gene (*atp9*) transcripts of Yunnan purple rice cytoplasmic male sterile line and its maintainer line, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5): 657-662
- Yang J.H., Zhang M.F., and Yu J.Q., 2007, Alterations of RNA editing for the mitochondrial *ATP9* gene in a new *orf220*-type cytoplasmic male-sterile line of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tumida*), *J. Integr. Plant Biol.*, 49(5): 672-677
- Zhao L.M., Sun H., Wang S.M., Wang Y.Q., Huan M., and Li J.P., 2004, Breeding of hybrid soybean HybSoy1, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Oil Crop Sciences)*, 26(3): 15-17 (赵丽梅, 孙寰, 王曙明, 王跃强, 黄梅, 李建平, 2004, 大豆杂交种杂交豆 1 号选育报告, *中国油料作物学报*, 26(3): 15-17)