

研究报告

Research Report

甘蓝型油菜 *BnPPR636* 及其启动子的克隆与表达分析

彭鹏飞¹, 胡琼¹, 李云昌¹, 刘道敏², 付丽¹, 张洪¹, 梅德圣¹

1. 中国农业科学院油料作物研究所国家油料作物改良中心, 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉, 430062

2. 安徽省六安市农业科学研究所, 六安, 2374001

✉ 通讯作者: deshengmei@hotmail.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第68篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0068

收稿日期: 2012年07月18日

接受日期: 2012年08月02日

发表日期: 2012年12月19日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期693-700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):

彭鹏飞等, 2012, 甘蓝型油菜 *BnPPR636* 及其启动子的克隆与表达分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.68 pp.1497-1504 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0068)

引用格式(英文):

Peng et al., 2012, Cloning and Expression Analysis of *BnPPR636* and Its Promoter in Rapeseed (*Brassica napus*), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.68 pp.1497-1504 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0068)

摘要 PPR 蛋白对植物的生长发育、逆境抗性以及育性具有重要的调节作用。本研究根据氨基酸序列的保守性, 利用 CODEHOP 方法, 通过简并引物扩增甘蓝型油菜基因组 DNA, 得到 PPR 基因片段。结合 RACE 技术, 在甘蓝型油菜品系 120 中扩增得到了 PPR 基因 cDNA 的全长序列。分析发现该 PPR 基因编码一个含 636 个氨基酸的蛋白质, 具有 11 个 PPR 基序, 不含有内含子, 具有典型的 PPR 基因特征, 命名为 *BnPPR636*。Blast 比对发现, *BnPPR636* 与白菜 P2 克隆的一个未知蛋白的氨基酸序列一致性最高, 达到 75%。RT-PCR 分析表明, *BnPPR636* 在花中的表达量最高, 在根与角果中的表达量次之, 叶和茎中较低。进化树分析表明, *BnPPR636* 蛋白与其他植物中和 CMS 育性恢复有关的 PPR 蛋白序列的一致性较高。以基因组 DNA 为模板, 利用染色体步移技术, 得到了 *BnPPR636* 基因起始密码子上游 1 145 bp 的 DNA 片段。经生物信息学软件分析表明, 该序列具有典型的启动子序列特征, 并含有许多相关的顺式作用元件, 可能参与调节花和根的发育。

关键词 油菜; 同源克隆; PPR 基因; CODEHOP; RACE; 染色体步移

Cloning and Expression Analysis of *BnPPR636* and Its Promoter in Rapeseed (*Brassica napus*)

Peng Pengfei¹, Hu Qiong¹, Li Yunchang¹, Liu Daoming², Fu Li¹, Zhang Hong¹, Mei Desheng¹

1. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Center for Oil Crops Improvement, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan, 430062, P.R. China

2. Agricultural Sciences Institute of Luan Municipal, Liu'an, 2374001, P.R. China

✉ Corresponding author, deshengmei@hotmail.com ✉ Authors

Abstract PPR protein plays an important role in plant development, especially for characters involved in fertility restoration and resistance to biotic and abiotic stresses. Based on the conserved amino acid sequence, a fragment of PPR gene was cloned in *Brassica napus* by CODEHOP method. The full length cDNA of the gene was amplified by RACE which contains an ORF of 1 908 bp in length encoding a protein with 636 amino acids including 11 PPR motifs, named *BnPPR636*. Genomic DNA sequence of *BnPPR636* was completely identical to the cDNA sequence, indicating no intron in the gene. The highest homology was found with an unknown protein of P2 clone of *B. rapa*, which had 75% identity to *BnPPR636*. RT-PCR with *BnPPR636* gene specific primers showed it was highly expressed in flower, moderately expressed in root and developing silique, with lowest expression in leaf and stem.

Phylogenetic analysis showed that *BnPPR636* had high consistency with the PPR protein sequence of other plants related to CMS Restoration. Using chromosome walking techniques, a 1 145 bp DNA fragment located upstream of the start codon of *BnPPR636* gene was obtained based on genomic DNA as template. Analysis of bioinformatics software showed the sequence had the typical characteristics of the promoter sequence, and contains many cis-acting elements, which may be involved in the regulation of flower and root development.

Keywords Rapeseed (*Brassica napus*); Homologous cloning; PPR gene; CODEHOP; SRACE; Chromosome walking

PPR (pentatricopeptide repeats)是在拟南芥基因组一个新基因家族, 是植物中最大的基因家族之一, 广泛分布于植物细胞核基因组中。PPR基因编码的

蛋白由多个含有35个氨基酸的PPR基序组成, 每个PPR基序含有非常保守的氨基酸残基, 如酪氨酸、赖氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸等(O'Toole et al., 2008)。基序的重复数目在2到26之间, 一般为12个。PPR基因序列比较简单, 一般不含有内含子序列, 或者含有极少数目的内含子(Andrés et al., 2007)。已鉴定的PPR蛋白中, 大约有50%蛋白的PPR基序呈串连重复排列。这些重复单元通过形成超螺旋而与单链RNA特异结合, 在植物发育和细胞器的形成过程中发挥重要的调控作用。

大多数PPR蛋白定位在线粒体和叶绿体, 具有细胞器定位信号肽, 与细胞器基因表达密切相关。前人研究表明PPR蛋白几乎参与线粒体基因表达的所有阶段(Schmitz-Linneweber and Small, 2008), 如RNA剪切、编辑、翻译以及稳定性, 对植物的生长发育尤其是逆境抗性和育性调控起关键作用(Kotera et al., 2005)。PPR基因在不同的物种之间具有高度同源性。在已克隆的植物细胞质雄性不育(CMS)的恢复基因中, 绝大多数都为PPR基因(Liu et al., 2012; 郝建轶等, 2011)。Geddy和Brown (2007)通过比较基因组学研究发现, 与其它PPR蛋白相比, 恢复基因所编码的PPR蛋白表现出更高的同源性。这一特征为进行与植物育性调控相关的PPR基因的克隆提供了重要依据。

近年来, 启动子序列的克隆与分析逐渐受到重视。在基因的表达调控中, 启动子作为基因表达的顺式作用元件, 起着十分重要的作用。研究启动子的结构, 可以推测目标基因的表达模式及功能。建立在PCR技术基础上的染色体步移技术(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR), 以基因组DNA为模板, 使用高退火温度及长的特异引物与低退火温度及短的简并引物组合, 通过高严谨性PCR和低严谨性PCR交替进行热不对称循环, 有效扩增特异产物, 具有简单快速、特异性高等特点, 是扩增基因侧翼序列的有效手段之一。当前, 对于大多数生物而言, 全基因组序列不易获得, 要从一个已知序列中得到其两侧区域的DNA序列, 染色体步移技术是一个非常好的选择(徐超等, 2011)。染色体步移技术利用已知序列设计PCR引物, 扩增与目标片段或区域相邻的未知序列或与其呈线性关系的未知序列, 在鉴定启动子序列、特定基因的上、下游序列以及分析转基因过程中外缘基因的插入位点等

方面发挥了重要作用(Liu et al., 1995; Liu and Wittier, 1995)。

PPR基因在植物CMS的育性调控中起着重要作用。Bentolila等(2002)用图位克隆的方法克隆了矮牵牛中的CMS育性恢复基因*Rf-PPR592*, 其编码的产物为含14个PPR基序的线粒体定位蛋白。Imai等(2003)克隆了萝卜CMS的恢复基因*Rfk1(Rfo)*, 该基因为含16个PPR基序的线粒体定位蛋白。BT型水稻CMS的恢复基因*Rf-1 (PRR791)*基因编码一个含PPR的线粒体定位蛋白(Komori et al., 2004)。高粱CMS的恢复基因*Rf2*也属于PPR蛋白家族基因, 其编码的PPR蛋白和水稻*Rf1*的PPR蛋白具有高度同源性。Xu等(2009)在玉米中克隆了5个编码PPR蛋白的基因(*PPR-814a*, *PPR-814b*, *PPR-814c*, *PPR-816*和*PPR-817*), 序列分析认为S型雄性不育细胞质的育性恢复基因可能为*PPR-814a*、*PPR-814b*和*PPR-814c*这三者中的一个(Klein et al., 2005)。本研究通过进化分析, 根据PPR蛋白的保守性利用简并引物设计软件CODEHOP (Liu and Huang, 1998)设计引物, 扩增甘蓝型油菜PPR基因的同源片段, 结合RACE (Rose et al., 1998)技术克隆甘蓝型油菜*Bn-PPR636*基因的全长cDNA序列和基因组序列, 并结合染色体步移技术, 采用TAIL-PCR获取启动子序列; 利用生物信息学软件分析启动子序列的顺式作用元件, 推导可能的激活位点, 为研究甘蓝型油菜中PPR基因的作用与功能、鉴定油菜CMS育性恢复基因奠定基础。

1 结果与分析

1.1 *BnPPR636*基因片段的克隆

采用CODEHOP设计的引物进行组合配对, 获得9个引物组合。经PCR扩增与筛选后, 发现引物组合MOTIF-E-1: TGCTTCTGCTATGGACCTGCTNM GNAARATGG与MOTIF-I-10: TGACAGCTGACAGCTGACAGAANCCNTGDAT扩增效果最好, 获得长度约为550 bp的特异性条带(图1)。测序结果表明所得片段大小为554 bp, 与拟南芥*AtPPR*基因(*At1-g12300*)具有非常高的相似性。在E值为 $2e^{-142}$ 下, 核苷酸序列的一致性达到77%; 与萝卜中一个与育性恢复有关的RAPD-PCR标记(AB458521)在E值为 $2e^{-116}$ 下一致性为84%, 证明该片段为甘蓝型油菜的PPR基因片段。

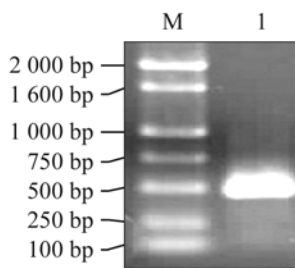


图1 PPR基因片段的扩增

注: M: 2000 bp DNA ladder marker; 1: PPR基因片段克隆

Figure 1 Amplification of PPR gene fragment from *B. napus* cDNA

Note: M: 2000 bp DNA ladder marker; 1: The fragment of PPR gene

1.2 *BnPPR636*基因全长序列的获得

3'RACE扩增出单一的条带(图2A), 5'RACE扩增出两条比较明显的条带(图2B)。测序发现3'RACE片段大小为695 bp, 与拟南芥的*PPR*同源。5'RACE的两个片段序列中, 小片段序列与拟南芥的*PPR*基

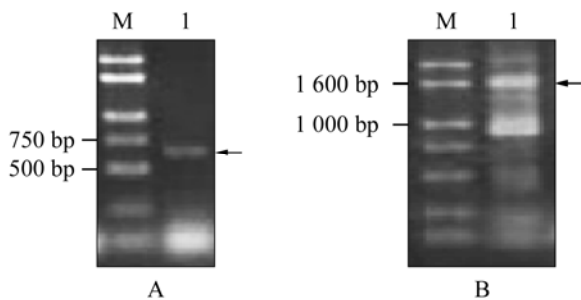


图2 3'RACE(A)和5'RACE(B)扩增产物的电泳图

注: M: 2000 bp DNA ladder marker; 1: PCR扩增产物

Figure 2 Amplified fragments of 3'RACE (A) and 5'RACE (B)

Note: M: 2000 bp DNA ladder marker; 1: Amplified fragments

因序列无同源性, 属于非特异性扩增; 大片段长度为1 629 bp, 与拟南芥的*PPR*同源。5'RACE与3'RACE的扩增片段存在160 bp的重叠序列, 利用CAP3序列拼接软件对5'RACE和3'RACE的序列进行全长序列拼接, 得到一条长度为2 164 bp的cDNA序列。经ORF find软件分析表明其开放阅读框序列为+37到+1947, 总长为1 908 bp, 编码636个氨基酸, 因此命名为*BnPPR636*。*BnPPR636*蛋白的理论分子量为71.3 KD, 等电点为8.11。经保守区域数据库(conserved domain database, CDD)分析表明*BnPPR636*具有11个PPR基序, 属于典型的PPR蛋白家族成员(图3)。利用拼接的cDNA序列设计引物, 分别以cDNA和DNA为模板扩增*BnPPR636* cDNA全长序列和基因组DNA序列时, 获得了大小相等的片段(图4)。序列比对分析发现, *BnPPR636*基因的cDNA序列与DNA序列完全相同, 不含内含子序列。

1.3 *BnPPR636*的进化分析

在NCBI上Blast搜索比对发现, *BnPPR636*与白菜P2克隆的一个未知蛋白的氨基酸序列的一致性最高, 达到75%; 与拟南芥的PPR序列和从萝卜转育到甘蓝型油菜的Ogura细胞质雄性不育系统恢复基因编码的氨基酸序列的一致性也较高。利用获得的同源性较高的蛋白序列, 包括白菜的ABQ505-46、拟南芥的CAR70003、Ogura细胞质雄性不育系统的恢复基因ACJ70132、萝卜的ACM24117、水稻的ABC42330、玉米的ACN24620、蓖麻的XP0025201-67、高粱的XP002465809、杨树的EEE76466、卷柏的XP002977337和大麦的CAJ32535, 采用MEGA5.0构建不同物种的PPR蛋白的系统发育树。从构建的系统发育树可以看出, *BnPPR636*与同为芸薹属的白

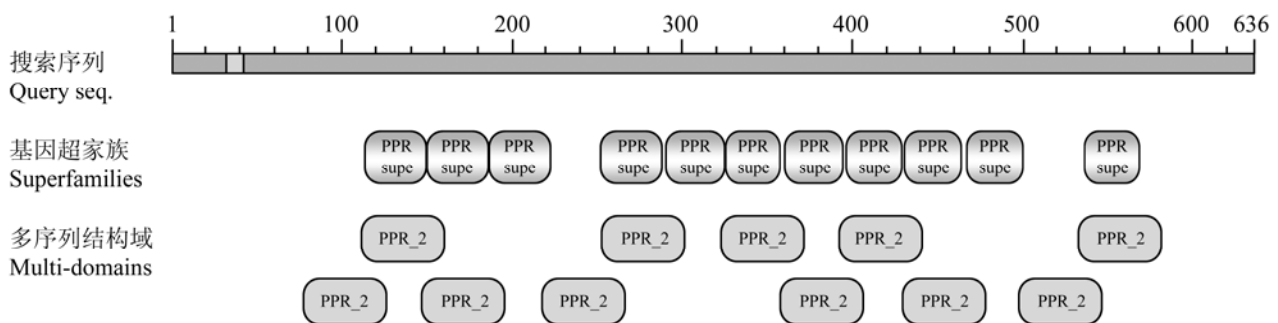


图3 *BnPPR636*序列中PPR基序分布

Figure 3 Distribution of PPR motif in *BnPPR636*

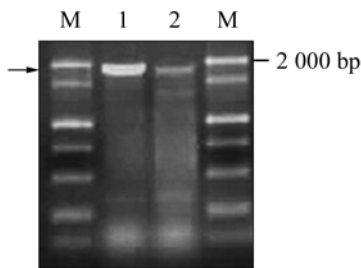


图4 *BnPPR636*基因全长cDNA (泳道1)与基因组DNA (泳道2)扩增结果

注: M: 2000 bp DNA ladder marker

Figure 4 Amplification of *BnPPR636* full length cDNA (Lane 1) and genomic DNA (Lane 2)

Note: M: 2000 bp DNA ladder marker

菜P2克隆上的一个未知功能蛋白聚在一起, 亲缘关系最近; 与同为十字花科的拟南芥的PPR蛋白亲缘关系次之, 聚在较近位置的还有油菜Ogura细胞质雄性不育系统的恢复基因和萝卜的恢复基因, 而与禾本科的水稻、高粱、大麦的PPR蛋白亲缘关系逐渐变远(图5)。玉米与水稻的PPR聚在一起, 蓖麻与高粱的PPR聚在一起, 而杨树、卷柏和大麦的PPR蛋白则被单独分开。通过进化树可以发现, PPR蛋白在进化上虽然较为保守, 但也出现了分化。该基因的系统发育进化树基本符合物种的进化规律。

1.4 *BnPPR636*的组织特异性表达分析

采用半定量RT-PCR法检测*BnPPR636*基因在根、茎、叶、花和角果5个不同组织中的相对表达量, 结果表明*BnPPR636*在花中的表达量最高, 在根中的表达量次之, 角果与叶片的表达量相对较弱, 在茎中的表达量最低(图6)。说明该基因可能与花的发育有关, 同时也参与根和角果的生理活动。

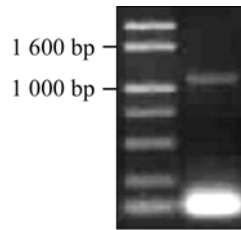


图6 *BnPPR636*的组织特异性表达分析

Figure 6 Tissue specific expression of *BnPPR636*

1.5 *BnPPR636*启动子的扩增

根据*BnPPR636*的5'末端DNA序列, 设计三条特异引物进行TAIL-PCR, 通过3轮热不对称PCR反应, 第三轮的PCR产物在1.2%的琼脂糖凝胶上电泳, 获得长度约为1 100 bp的DNA片段(图7)。序列分析发现其实际长度为1 145 bp。利用在线启动子分析软件(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)预测结果表明此片段具备启动子的基本特征。

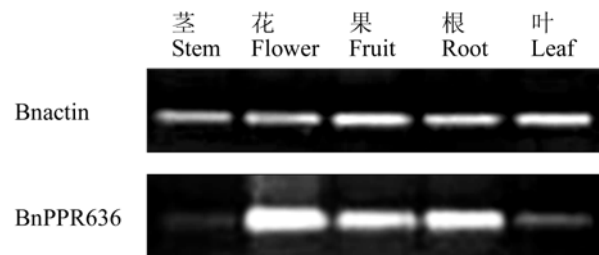


图7 *BnPPR636*启动子扩增电泳图

Figure 7 PCR amplification of *BnPPR636* promoter

利用PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)预测分析核心启动子区域和有关的顺式作用元件结合位点, 结果显示1 145 bp的区域中含有多种启动子通用元件(图8), 如TATA-box、TSS

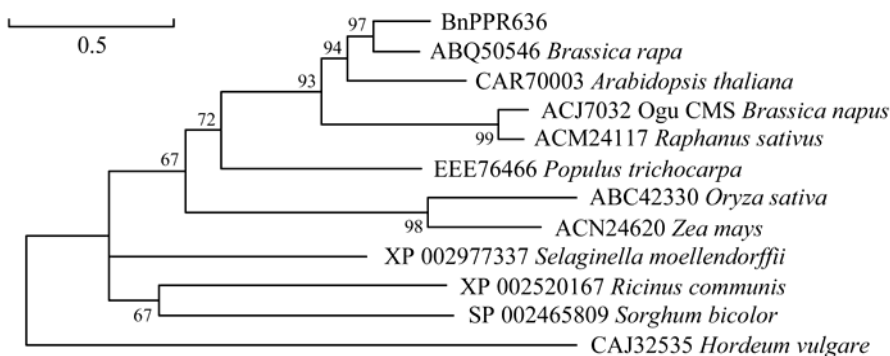


图5 不同植物种与*BnPPR636*同源的PPR蛋白进化分析

Figure 5 Phylogenetic analysis of PPR proteins homologous to *BnPPR636* in various plant species

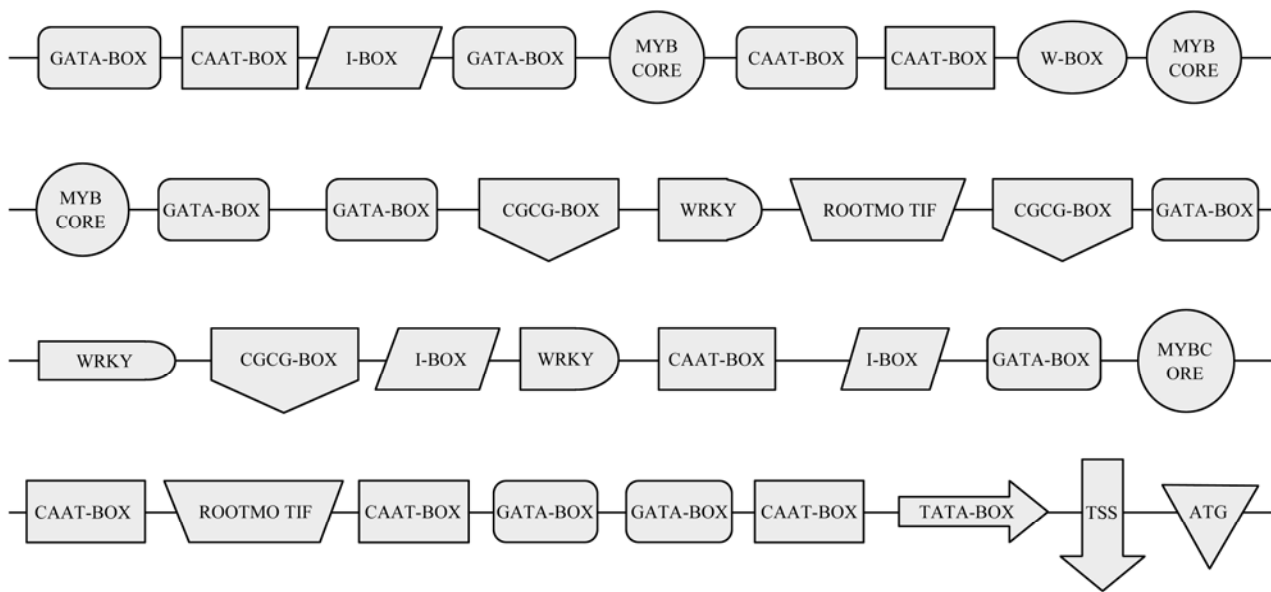


图8 BnPPR636启动子顺式作用元件分布图
Figure 8 Distribution of CIS-acting elements in the promoter of BnPPR636

(转录起始位点), 和一些转录因子结合位点, 如: GATA-box, WRKY710S, MYBPZM等。另外还发现一些与根有关的组织特异性元件, 如CAAT-BOX; 与胁迫有关的元件, 如MYBCORE; 以及与光调控相关的应答位点, 如I-BOX。预测结果表明此序列能代表BnPPR636的启动子序列信息。

2讨论

同源克隆是基因克隆的主要方法之一, 由于其工作量小, 省时省力, 且针对性强, 逐渐得到广泛应用。同源克隆成败的关键在于所选用序列的保守性。由于氨基酸序列的保守性强于核苷酸序列, CODEHOP方法利用氨基酸序列的保守性设计简并引物, 与利用核苷酸序列设计的简并引物相比较, 能更加有效地降低引物的简并性, 从而提高特异性。CODEHOP方法设计的引物分为5'夹板端和3'核心区两部分。5'夹板端由20至30个碱基组成, 主要对退火温度起作用, 提高PCR的效率; 3'核心区由根据氨基酸序列设计的简并引物组成。在PCR过程中, 主要由3'核心区引物序列与模板配对(Liu and Huang, 1998)。5'夹板端和3'核心区共同作用可以有效地增强扩增的特异性, 提高基因克隆的效率。本研究利用CODEHOP方法共设计了6条引物, 组成9个引物对, 仅用1个能很好扩增出明显片段的引物对就获得了预期的PPR基因, 证明了该方法的高效性。

RACE技术是以PCR为基础, 利用特异引物和通用引物相结合, 快速扩增cDNA 5'末端和3'末端的一种方法。近年来RACE技术得到了极快的发展, 在基因全长序列扩增中应用广泛。许多实验室都利用RACE技术成功得到了基因的cDNA全长(Rose et al., 1998; Chai et al., 2010; 何聪芬等, 2011)。本研究在利用CODEHOP简并引物扩增出目标特异片段的基础上, 结合RACE技术在甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育(Pol CMS)的恢复系中成功获得BnPPR636基因。推导的氨基酸序列分析结果证实BnPPR636与已经发表的一些PPR蛋白, 特别是与甘蓝型油菜细胞质雄性不育育性恢复基因的氨基酸序列相似性较高, 如与Ogura CMS恢复基因的氨基酸序列和白菜的一个未知蛋白ABQ50546.1的序列相似性都较高。其中ABQ50546.1是从白菜的一个对波里马CMS具有育性恢复性能品系的基因组文库中鉴定出来的, 与育性恢复相关的可能性较大(Geddy and Brown, 2007)。与拟南芥中同源性最高的PPR基因是At1g12300 (基因库中蛋白编号CAR70003), 在1 774 bp序列长度范围内有1 409个碱基是相同的, 同源性高达79%。Liu等(2012)通过图位克隆获得的波里马CMS的候选恢复基因ORF2也是与At1g12300同源性最高。如果BnPPR636与ORF2为同一基因, 则本研究利用同源克隆获得目标基因比图位克隆简单快速得多。但BnPPR636是不是恢复基因, 还有待

于进一步验证。至少有一点可以相信,油菜波里马CMS的恢复基因,与拟南芥中众多的PPR基因中的At1g12300是同源等位基因的可能性极高。

我们曾利用可扩增*BnPPR636*全长基因的引物对甘蓝型油菜的一些品系进行PPR基因克隆,序列分析的结果表明,*BnPPR636*基因在不同的品系之间存在着广泛的核苷酸差异,这种多态性是否与表型性状相关,尚需要进一步的试验验证。通过分析*BnPPR636*启动子的序列,发现该启动子序列中含有许多转录因子的结合位点。半定量RT-PCR分析结果,*BnPPR636*基因在花中表达量最高,其次是在根中的表达量,表明*BnPPR636*与花和根的发育有关。启动子结构分析发现其中含有与光调控相关的应答位点、与根有关的组织特异性元件和与胁迫有关的元件,进一步印证了*BnPPR636*与花和根的发育相关。明确本研究克隆的*BnPPR636*基因的功能,可以利用启动子序列,构建启动子驱动的GUS或者GFP表达载体进行遗传转化研究,观察其表达部位。同时可以构建*BnPPR636*的正义或反义基因表达载体,转化至油菜中,观察其生理生化变化,以进一步确定PPR蛋白家族基因在甘蓝型油菜中的作用。

3材料与方法

3.1材料

实验材料为甘蓝型油菜POL CMS的恢复系120,由中国农业科学院油料作物研究所油菜杂种优势利用课题组提供。

3.2试验载体,菌株及生化试剂

克隆载体pMD18-T、大肠杆菌菌株DH5 α 、Ex *Taq*聚合酶(5 U/ μ L)购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA Marker和dNTPs (10 mmol/L)购自鼎国(北京)公司; Dnase购于Progema公司,总RNA提取液Trizol和RNA反转录试剂盒购于Invitrogen公司, DNA回收纯化试剂盒购于OMEGA公司。其他试剂均为国产分析纯。

3.3总DNA和总RNA的提取

采用CTAB法提取植物花蕾DNA, Trizol法提取植物的总RNA,用Dnase消化以去除DNA污染,1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA和RNA质量。

3.4 *BnPPR636*基因片段的克隆

根据在NCBI上已登录的植物PPR蛋白的氨基

酸序列,选取与拟南芥、白菜、萝卜和野芥等与甘蓝型油菜亲缘关系较近的物种的PPR蛋白的氨基酸序列为对比序列,提交到Blockmaker (<http://blocks1-fhrc.org/blocks/blockmkr/make-blocks1.html>) 进行保守区查找,将得到的保守区中最保守的氨基酸序列提交到CODEHOP,综合考虑扩增片段的长度进行引物设计。选用其中简并度小、 T_m 值适当及目的片段长度合适的引物序列送上海生物工程公司合成。PCR扩增体系为:*Taq* MIX 10 μ L (购自GeneStar, DNA模板1 μ L, 正反向引物各2.5 μ L (10 μ mol/L), ddH $_2$ O 4 μ L。PCR扩增采用降落(touchdown) PCR程序,即95 $^{\circ}$ C 2 min, (94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 退火温度每个循环下降1 $^{\circ}$ C, 共14个循环; 然后(95 $^{\circ}$ C 30 s, 40 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 25个循环。PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳检测,利用OMEGA公司的胶回收试剂盒回收产物,纯化后与PMD18-T载体连接,转化大肠杆菌DH5 α , 蓝白斑筛选重组子,菌落PCR鉴定正确的阳性克隆送至英俊生物技术有限公司(上海)测序。

3.5 *BnPPR636*基因全长cDNA的克隆

按照Clontech公司的SMARTer RACE cDNA Amplification试剂盒说明书的引物设计原则,利用3.4中获得的PPR基因片段核苷酸序列,分别设计3'RACE与5'RACE特异引物GSP-F: 5'-ATGGCGAACTAG-AAGAGGCTTTGGG-3'和5'-GSP-R: CGCTCCTT-TGACATTGAGGCTACAGA-3'。3'RACE与5'RACE过程中cDNA第一条链的合成及PCR反应体系的配置和扩增均按照Clontech公司试剂盒说明书进行。PCR反应的总体积为50 μ L, 成分为: cDNA第一链2.5 μ L, GSP (10 μ mol/L) 1.0 μ L, UPM (10 \times) 5.0 μ L, Master Mix 41.5 μ L。PCR反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 27个循环; 共35个循环。PCR产物片段纯化、克隆和测序同3.4。

3.6 *BnPPR636*基因全长序列的PCR扩增

根据拼接cDNA序列的5'端和3'端设计引物All-F (5' -GGAATGATTCATCTGAAGAAGAAGAA-3')和All-R (5'-TTATGATATGTCTCGAAAAGGAC-CA-3'), 分别以基因组DNA及cDNA为模板扩增基因全长, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s,

72°C 2 min, 34个循环; 最后再72°C延伸10 min。PCR产物电泳检测、回收、克隆、测序同3.4。

3.7 *BnPPR636*基因的组织特异性表达分析

在植株生长期间分别提取根、茎、叶、花和发育角果的总RNA, 反转录成cDNA后, 根据Chai等(2010)采用半定量法检测*BnPPR636*基因在不同组织中的相对表达量, 以甘蓝型油菜的看家基因*Bnactin* (GenBank登录号: AF1118122)为内参进行半定量PCR分析。引物组合如下: PPR-ALONE-F: 5'-AGATGGTGATACGAAGAACA-3', PPR-ALONE-R: 5'-AAAAGGTTGAGGGCATCGTC-3'; Actin-F: 5'-TCTGGCATCACACTTTCTACAACGAGC-3', Actin-R: 5'-CAGGGAACATGGTTCGAACCACC-3'。

3.8 启动子的扩增

利用油菜基因组DNA作为模板, 使用Genome-walking试剂盒(Takara公司)扩增油菜*BnPPR636*启动子序列。根据*BnPPR636*的全长序列, 设计3条引物SP1 (5'-TGGCAACTGAACCAAACAATC-3'), SP2 (5'-CCGAGGCTGAACCAATGCCAAAG-3')和SP3 (5'-TCCTTTTTCCTTAGGGCATAAC-3')。以试剂盒提供的AP2引物作为上游引物, 以SP1、SP2、SP3引物分别作为下游引物进行3轮热不对称PCR反应。具体PCR过程严格按照试剂盒说明进行。PCR产物电泳检测、回收、克隆、测序同3.4。

作者贡献

梅德圣提出并设计本研究, 胡琼和李云昌负责研究的指导和材料提供, 三位均参与论文写作与修改润色; 彭鹏飞负责具体试验的执行和初稿写作; 刘道敏、付丽参加部分PCR试验, 张洪参与生物信息分析和引物设计。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家863计划课题(2011AA10A104)、国家支撑计划课题(2011BAD35B04)和湖北省研究与开发项目(2011-2015)提供经费支持。

参考文献

Andrés C., Lurin C., and Small I.D., 2007, The multifarious roles of PPR protein in plant mitochondrial gene expression, *Physiol. Plantarum*, 129: 14-22 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00766.x>
Bentolila S., Alfonso A., and Hanson M.R., 2002, A pentatri-

copeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99 (16): 10887-10892 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1023015-99> PMID:12136123 PMCID:125068
Chai G., Bai Z., Wei F., King G.J., Wang C., Shi L., Dong C., Chen H., and Liu S., 2010, *Brassica* GLABRA2 genes: analysis of function related to seed oil content and development of functional markers, *Theor. Appl. Genet.*, 120(8): 1597-1610 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-010-1279-8> PMID:20162256
Geddy R., and Brown G.G., 2007, Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection, *BMC Genomics*, 8: 130 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-130> PMID:17521445 PMCID:1892557
Hao J.Y., Li Y.C., Hu Q., Mei D.S., Li Y.D., and Xu Y.S., 2011, Putative fragment cloning of Nsa CMS restoration gene in *Brassica napus*, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Oil Crop Sciences), 33(5): 433-437 (郝建轶, 李云昌, 胡琼, 梅德圣, 李英德, 徐育松, 2011, 油菜野芥细胞质雄性不育恢复基因候选片段的克隆, *中国油料作物学报*, 33(5): 433-437)
He C.F., Liu L., Dong Y.M., Zhang S.P., Zhuang C.Y., Yao N., and Li L.B., 2011, Cloning and bioinformatic analysis of lignin synthase gene in bamboo, *Xibei Zhiwu Xuebao* (*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 31(2): 273-279 (何聪芬, 刘蕾, 董银卯, 张淑萍, 庄彩云, 姚娜, 李潞滨, 2011, 竹子木质素合成酶基因克隆与分析, *西北植物学报*, 31(2): 273-279)
Imai R., Koizuka N., Fujimoto H., Hayakawa T., Sakai T., and Imamura J., 2003, Delimitation of the fertility restorer locus *Rfk1* to a 43 kb contig in Kosena radish (*Raphanus sativus* L.), *Mol. Genet. Genomics*, 269(3): 388-394 <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-003-0847-x> PMID:12712328
Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., and Schertz K.F., 2005, Fertility restorer locus *Rfl* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12, *Theor. Appl. Genet.*, 111(6): 994-1012 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-2011-y> PMID:16078015
Komori T., Ohta S., Murai N., Takakura Y., Kuraya Y., Suzuki S., Hiei Y., Imaseki H., and Nitta N., 2004, Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant J.*, 37(3): 315-325 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01961.x> PMID:14731253
Kotera E., Tasaka M., and Shikanai T., 2005, A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts,

- Nature, 433(7023): 326-330 <http://dx.doi.org/10.1038/nature03229> PMID:15662426
- Liu Y.G., and Huang N., 1998, Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16(2): 175-181 <http://dx.doi.org/10.1023/A:10074209-18645>
- Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T., and Whittier R.F., 1995, Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T2DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR, *Plant J.*, 8(3): 457-463 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113.1995.08030457.x> PMID:7550382
- Liu Y.G., and Whittier R.F., 1995, Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking, *Genomics*, 25(3): 674-681 [http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80010-J](http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543(95)80010-J)
- Liu Z., Liu P.W., Long F.R., Hong D.F., He Q.B., and Yang G.S., 2012, Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene *Rfp* for *pol* CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 125(4): 773-779 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-012-1870-2> PMID:22614178
- O'Toole N., Hattori M., Andres C., Iida K., Lurin C., Schmitz-Linneweber C., Sugita M., and Small I., 2008, On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants, *Mol. Biol. Evol.*, 25(6): 1120-1128 <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn057> PMID:18343892
- Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M., and Henikoff S., 1998, Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences, *Nucleic Acids Res.*, 26(7): 1628-1635 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/26.7.1628> PMID:9512532 PMID:147464
- Schmitz-Linneweber C., and Small I., 2008, Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression, *Trends Plant Sci.*, 13(12): 663-670 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.001> PMID:19004664
- Small I.D., and Peeters N., 2000, The PPR motif-a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 25(2): 46-47 [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01520-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01520-0)
- Xu C., Yang Y.N., Wang Y., Zhang M.H., Xie W.H., Yang W.D., Liu J.S., and Li H.Y., 2011, Molecular cloning and characterization of the promoter of *Vigna radiata* 8S globulin gene, *Xibe Zhiwu Xuebao (Acta Botanica BorealiOccidentalia Sinica)*, 31(2): 242-247 (徐超, 杨悦宁, 王吟, 张梦晗, 谢伟红, 杨维东, 刘洁生, 李宏业, 2011, 绿豆种子8S球蛋白基因启动子的克隆及分析, *西北植物学报*, 31(2): 242-247)
- Xu X.B., Liu Z.X., Zhang D.F., Liu Y., Song W.B., Li S.S., and Dai J.R., 2009, Isolation and analysis of rice Rf1-Orthologous PPR genes co-segregating with *Rf3* in maize, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 27(4): 511-517 <http://dx.doi.org/10.1007/s11105-009-0105-4>