

徐 娅,黄佑岗,李树杏. 水稻核糖体失活蛋白家族基因 *OsRIP8* 的生物信息学与功能分析[J]. 江苏农业科学,2024,52(4):71-79.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.04.010

水稻核糖体失活蛋白家族基因 *OsRIP8* 的生物信息学与功能分析

徐 娅,黄佑岗,李树杏

(贵州省农业科学院水稻研究所,贵州贵阳 550006)

摘要:核糖体失活蛋白(RIPs)是一种能使真核细胞核糖体功能被抑制的毒蛋白。*OsRIP8* 是属于该家族的一个功能未知基因。为研究该基因生物学功能,通过数据库对其进行生物信息学分析,利用 qRT-PCR 验证其表达模式,同时构建 *OsRIP8*-RNAi 干涉载体并利用农杆菌转化水稻,采用 PCR 技术鉴定出转基因阳性植株,分析阳性植株的表达和农艺性状,初步揭示该基因的功能。结果表明,水稻 *OsRIP8* 蛋白为不稳定亲水蛋白,不含信号肽及完整的跨膜结构域,蛋白结构以 α 螺旋为主;在 *OsRIP8* 基因启动子区域存在着与植物生长发育、生物与非生物胁迫以及植物激素响应有关的元件;*OsRIP8* 基因的共表达基因富集到多种大分子的生物合成与蛋白代谢等途径;qRT-PCR 分析结果表明,*OsRIP8* 基因在发育的小穗及抽穗前 1 d 的花药中优先表达;RNAi 干涉后 *OsRIP8* 基因的表达下调造成植株花粉育性和结实率显著降低。暗示该基因对水稻小穗的发育具有重要作用,可能参与调控花粉发育过程。

关键词:水稻;核糖体失活蛋白;生物信息学分析;功能分析;基因表达

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)04-0071-09

核糖体失活蛋白(RIPs)是一类通过去除核糖体 RNA 的腺嘌呤残基从而使核糖体结构被破坏无法正常结合蛋白质合成时的延伸因子,进而导致蛋白质生物合成受抑制的一类毒蛋白,大部分存在于植物体中^[1]。根据核糖体失活蛋白的大小、结构及组成,一般将 RIPs 分为 3 个类型^[2]。第 I 类分子量

约为 30 ku,为单肽链,具有 RNA *N*-糖苷酶活性,该类型分布最为广泛,但由于缺少与细胞结合的配体 B 链而不能进入细胞内,对无细胞结构系统的蛋白合成有抑制作用,对完整细胞的毒性很小^[3]。第 II 类分子量约为 60 ku,由 A 链和 B 链组成,其中 A 链与 I 型 RIPs 的多肽链相似,B 链具有凝集素(lectin)活性,能识别并结合细胞膜上的特异受体^[4]。第 III 类 RIPs 是先合成无活性前体,经酶解加工后产生 2 个大小分别为 16.5、8.5 ku 的亚基,该类型 RIPs 较为少见,仅在玉米和大麦中被鉴定出来^[5-6]。诸多研究发现,RIPs 对病毒、真菌和昆虫均能产生抗性^[7-10],这为作物病虫害防治提供了新的解决思路,故而 RIPs 的功能研究受到植物抗病虫害领域研究者的普遍关注。

早期已报道的 RIPs 多以烟草为受体植物进行

收稿日期:2023-04-12

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合基础[2020]1Z020);贵州省农业科学院青年科技基金(编号:黔农科院青年基金[2019]01号);贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2022]重点028号);贵州省水稻研究所青年基金(编号:黔水稻所青年基金[2021]018号)。

作者简介:徐 娅(1991—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,研究方向为水稻生殖发育生物学。E-mail:xu_ya_1991@163.com。

通信作者:李树杏,硕士,正高级农艺师,研究方向为水稻栽培生理学。E-mail:24406882@qq.com。

[26] Alvy R I, Mubassir M H M. Effect of D128N mutation on OsSERK2 in Xa21 mediated immune complex; an in-silico study[J/OL]. bioRxiv, 2022(2022-11-30)[2023-05-28]. <https://doi.org/10.1101/2022.11.30.518629>.

[27] Upadhyay S K. Calcium channels, OST1 and stomatal defence; current status and beyond[J]. Cells, 2022, 12(1):127.

[28] Tian W, Hou C C, Ren Z J, et al. A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity[J]. Nature, 2019, 572(7767):131-135.

[29] Zafari S, Vanlerberghe G C, Igamberdiev A U. The role of alternative oxidase in the interplay between nitric oxide, reactive oxygen species, and ethylene in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants incubated under normoxic and hypoxic conditions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13):7153.

[30] Wang J, Nan N, Shi L L, et al. *Arabidopsis* BRCA1 represses RRTF1-mediated ROS production and ROS-responsive gene expression under dehydration stress[J]. New Phytologist, 2020, 228(5):1591-1610.

试验, Huang 等从麻疯树幼苗中分离出核糖体失活蛋白(curcin 2)的 cDNA, 将其转入烟草后发现转基因植株立枯丝核菌的抗性增加显著^[11]; Krishnan 等将来自于药用植物栝楼的天花粉蛋白(TCS)重组后转入烟草, 转基因烟草植株对于黄瓜花叶病毒和烟草花叶病毒(TMV)的感染较对照有所延迟且症状较轻^[12]。后来转 *RIPs* 基因的受体植物拓展至水稻等粮食作物上, 例如在 Qian 等的研究中, 在水稻中异源表达苦瓜素(α -MC)可有效防止转基因水稻中稻瘟病的发生^[13]; Kim 等认为几丁质酶与核糖体失活蛋白具有很强的协同作用, 他们将水稻几丁质酶基因同玉米核糖体失活蛋白基因协同在转基因水稻中表达, 最终获得纹枯病抗性植株^[14]。这些研究均围绕外源基因展开。近些年有几个水稻自身 *RIP* 基因被克隆出来, 这些 *RIPs* 在体外试验以及转基因植株中对病虫害都具有一定的抗性。在水稻中过表达水稻 *RIP* 基因 *OsRIP8* 后, 水稻对于干旱和盐胁迫的耐受性比野生型显著提高^[15]; de Zaeytjij 等发现在被褐飞虱侵染的水稻植株中, *OsRIP1* 的表达被高度诱导, 其重组蛋白对褐飞虱有一定的毒力, 能在体外灭活昆虫核糖体^[16]; Wytynck 等构建了过表达 *OsRIP1* 以及 *nuRIP* 的转基因株系, 温室条件下过表达 *nuRIP* 的植株茎长显著缩短。此外, 还研究了转基因幼苗对于干旱、盐、脱落酸和茉莉酸甲酯处理的响应性能, 结果表明, 这 2 种 *RIP* 均可影响茉莉酸甲酯介导的胁迫反应^[17]。Jiang 等和 Wytynck 等 2 个团队先后鉴定了水稻全基因组中的核糖体失活蛋白^[18-19], 绝大部分未见功能报道。

本研究发现水稻 *RIPs* 家族基因 *OsRIP8* 在水稻小穗中高表达, 暗示其对于水稻生殖发育具有重要作用。采用生物信息学的方法对水稻 *OsRIP8* 蛋白的结构、功能和基因表达模式等进行分析, 构建 *OsRIP8* 干扰载体并转化水稻获得表达量下调的转基因植株, 对转基因植株及野生型植株农艺性状进行观察与统计对比, 初步揭示 *OsRIP8* 在水稻中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试水稻品种 本研究采用的水稻品种是粳稻中花 11 号(Zhonghua11, ZH11), 于 2019 年种植于华中农业大学试验田。

1.1.2 菌株与载体 本研究所用菌株有克隆菌株

大肠杆菌 DH5 α , 水稻遗传转化菌株农杆菌 EHA105。常用载体有 T 载体 pMD18-T (TaKaRa 公司); RNAi 载体为 pDS1301。

1.1.3 试剂与仪器 抽提 RNA 所用的 RNAiso、RNase-free DNase I、扩增基因序列所用 LA *Taq* 酶及荧光定量所用的 SYBR Premix EX *Taq* Master Mix、ROX Reference Dye II 均购自 TaKaRa 公司; 消化 30 min 去除 DNA。反转录使用的酶 M-MLV 购自 Promega 公司, 引物为 oligo(dT)。所用仪器是 ABI StepOneTM 实时荧光定量 PCR 仪。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 水稻 *OsRIP8* 蛋白的性质和结构分析 水稻 *OsRIP8* 蛋白的性质和结构分析通过 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 所提供的蛋白序列分析工具, 对 *OsRIP8* 蛋白的理化性质(分子量、理论 pI、正负电荷残基总数及半衰期等)进行预测与分析。利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测疏水性/亲水性, 用 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service/SingalP-3.01>) 对蛋白质的信号肽进行预测, 用 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测其跨膜结构域, 用 NetPhos (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 预测磷酸化位点。通过 SMART 工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 *OsRIP8* 蛋白的结构域, 利用在线网站 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 对 *OsRIP8* 蛋白的二级结构进行预测, 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 同源建模网站预测 *OsRIP8* 蛋白的三级结构。

1.2.2 水稻 *OsRIP8* 基因共表达基因的 GO 富集和 KEGG 富集分析 通过 IC4R 数据库 (<http://expression.ic4r.org/co-search>) 中的共表达数据, 筛选皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient, PCC)大于 0.8 的基因作为 *OsRIP8* 基因的共表达基因。然后通过 agriGO 网站 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) 以及 Kobas 网站 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/genelist/>) 对这些基因进行 GO 富集和 KEGG 富集分析。

1.2.3 水稻 *OsRIP8* 基因表达分析与启动子顺式作用元件分析 *OsRIP8* 基因在明恢 63(MH63) 各发育阶段的表达数据从 CREP 数据库获得 (<http://crep.ncpgr.cn/>)。选取 *OsRIP8* 基因起始密码子

ATG 上游 2 kb 的 DNA 序列,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)网站进行 *OsRIP8* 启动子顺式作用元件分析。

1.3 RNA 提取、反转录和实时荧光定量 PCR 检测

水稻样品 RNA 抽提采用 TRIzol 抽提试剂盒 (Invitrogen, USA) 进行,样品(新鲜叶片或者稻穗等)经液氮充分研磨,具体操作步骤详见试剂盒说明书。提取完成后自然风干,加入灭菌的 DEPC 水 20 μ L 溶解,于 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, 美国)检测 RNA 质量, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

取抽提好的 RNA 5 μ L 作为模板,加入 1 μ L DNase 和 1 μ L DNase Buffer,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min,以去除 RNA 样品中的 DNA 污染。RNA 的反转录采用 M-MLV 反转录酶进行操作,具体操作详见说明书。反转录产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

RNAi 转基因植株的表达量检测以及基因表达谱检测,引物为 QRIP8-F/R(表 1),均采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪进行检测分析,循环数设为 40 个,具体分析操作参照 2 \times SYBR Premix EX Taq (TaKaRa) 试剂盒以及仪器提供的标准定量 PCR 分析方法。每个样品 3 次重复,以 *Ubiquitin* 作为内参基因,引物信息见表 1。

1.4 *OsRIP8* - RNAi 干涉载体的构建及遗传转化

OsRIP8 - RNAi 干涉转化载体的构建:采用 pDS1301,根据基因的编码序列(CDS)设计扩增产物为 447 bp 的特异引物 IRIP8-F/R,见表 1。特异片段经 PCR 扩增后连 T 载体,测序确定片段正确后,采用双酶切获得目的片段,并分别连到 pDS1301 的多克隆位点。

采用 CaCl_2 法将构建好的载体转至农杆菌菌株 EHA105 中,挑取阳性农杆菌菌液保存备用。农杆菌介导的水稻愈伤遗传转化受体材料为 ZH11,具体操作流程参照 Wu 等建立的高效水稻遗传转化体系^[20]。

1.5 转基因植株 DNA 提取、PCR 阳性检测

水稻样品 DNA 提取采用改进的 CTAB 法(小样快速制备法),具体操作步骤参照 Hills 等的方法^[21],沉淀自然风干后,加 30 ~ 50 μ L ddH₂O 溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

RNAi 转基因植株通过 PCR 进行阳性检测,以潮霉素引物 Hpt-F/R 对 RNAi 转基因植株进行 PCR 阳性检测(表 1)。选取阳性植株进行加代种植以及

后续试验。

1.6 转基因植株表型鉴定及农艺性状统计

对 RNAi 转基因植株以 ZH11 为对照,观察记录突变体和 RNAi 转基因植株的农艺性状,包括结实率、萌发率、花粉育性等。收取种子后,对结实率等农艺性状进行考察分析,每个家系选取 20 个单株进行考种,采用 Excel 2013 进行数据统计和差异显著性分析。

使用 1% I₂ - KI 溶液检测花粉育性(即淀粉积累)。材料取自 RNAi 转基因植株和野生型,每个家系取 25 个单株,每个单株取 3 个不同稻穗上的 3 朵小花。将碘液滴加在玻片上,然后将花粉粒剥离并置于滴有碘液的玻片上,用镊子挤压,使花粉游离在玻片上,染色 2 ~ 3 min 后盖上盖玻片镜检观察。同样剥离即将开放的小花,放置于滴有萌发液的载玻片上进行萌发,取样数量、方法与碘染相同。萌发环境湿度需大于 90%,温度为 35 $^{\circ}$ C。制好的片子用光学显微镜 (BX53, Olympus, 日本) 观察,用 SPOT FLEXTM CCD (Diagnostic Instrument, 美国) 进行显微摄影,获得的花粉育性数据采用 Excel 2013 统计并进行差异显著性分析。

1.7 水稻 *OsRIP8* 基因的克隆

根据 *OsRIP8* 的 CDS 加入酶切位点及保护碱基设计克隆引物 CRIP8-F/R(表 1),以中花 11 的 cDNA 为模板进行扩增。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用回收试剂盒回收后进行 TA 克隆,转化后对菌液进行测序。

2 结果与分析

2.1 水稻 *OsRIP8* 蛋白的性质

水稻 *OsRIP8* 基因的基因组序列全长 5 387 bp,包括 4 个内含子、5 个外显子。CDS 全长 1 062 bp,编码 353 个氨基酸。*OsRIP8* 蛋白分子量为 39.621 7 ku,理论 pI 为 8.7,负电荷残基总数 (Asp + Glu) 为 43,正电荷残基总数 (Arg + Lys) 为 47,分子式: C₁₇₆₄ H₂₈₂₀ N₄₈₆ O₅₁₇ S₁₆,总原子数为 5 603,脂肪酸指数为 90.88,不稳定指数 (II) 为 41,该蛋白为不稳定蛋白。*OsRIP8* 蛋白磷酸化位点有 35 个,包括 Ser 17 个、Thr 12 个和 Tyr 6 个(图 1 - A)。信号肽平均分 (S 值) 为 0.004 7,说明该蛋白不含有信号肽(图 1 - B)。平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.256,为亲水蛋白(图 1 - C)。该蛋白不存在完整的跨膜结构(图 1 - D)。

表1 引物信息

引物名称	序列(5'→3')	内切酶
QRIP8 - F	AGGGGTCCGTTACCTTGGCTTT	
QRIP8 - R	GGAACCCGGGATCAAAACTTTG	
Ubi - F	AACCAGCTGAGGCCCAAGA	
Ubi - R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA	
IRIP8 - F	GG <u>ACTAGTGGTACCT</u> ACCCAGACTAATTGCC	Spe I、Kpn I
IRIP8 - R	C <u>GAGCTCGGATCCC</u> ACTTGAAAGCATACCCC	Sac I、BamH I
Hpt - F	TCCATACAAGCCAACCAC	
Hpt - R	TGAAAAAGCCTGAACTCAC	
CRIP8 - F	GGGGTACCATGAGACGGGTGTATGCATTCC	Kpn I
CRIP8 - R	GGGGTACC <u>GACTGGGG</u> TCATTAATCC	Kpn I

注:下划线表示酶切位点。

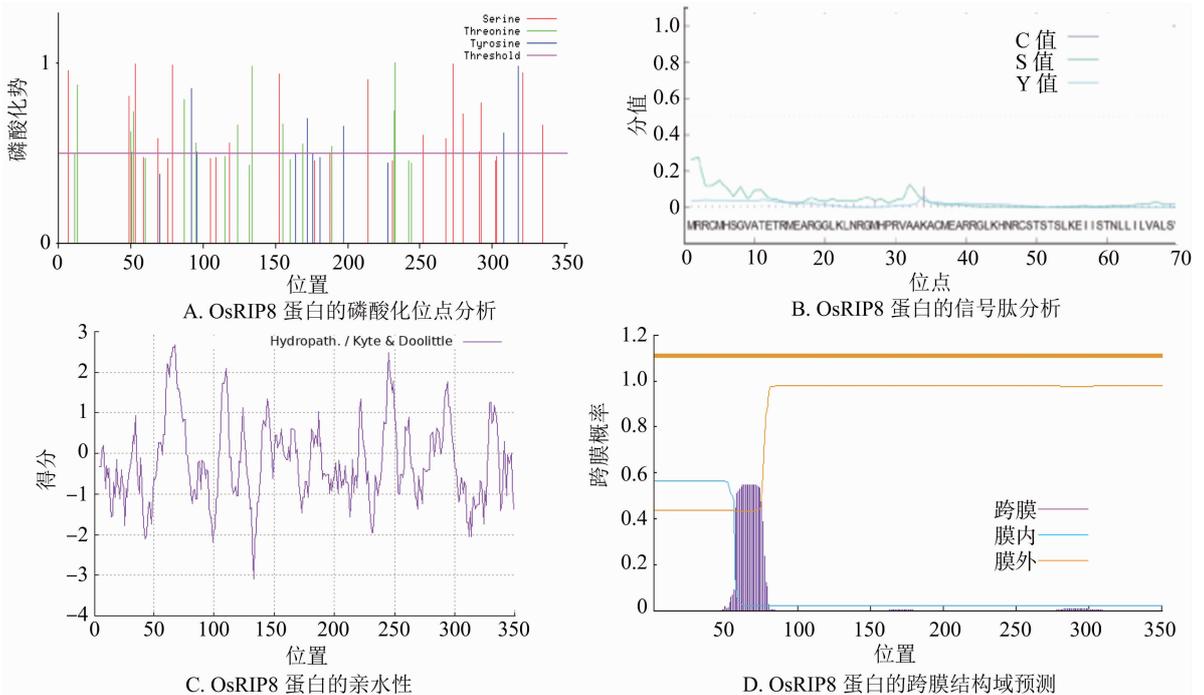


图1 OsRIP8 蛋白的性质分析结果

2.2 水稻 OsRIP8 蛋白的结构

二级结构预测结果显示,OsRIP8 蛋白有 3 种二级结构,其中 α 螺旋有 167 个氨基酸残基参与,占 47.31%;延伸链有 45 个氨基酸残基参与,占 12.75%;无规则卷曲有 141 个氨基酸残基参与,占 39.94% (图 2 - A)。从三级结构可以看出,水稻 OsRIP8 蛋白的三级结构以 α 螺旋为主(图 2 - B)。

2.3 水稻 OsRIP8 基因共表达基因的 GO 富集和 KEGG 富集

为探索 OsRIP8 可能的调控机制,在 IC4R 数据库中检索与其表达相关系数超过 0.8 的基因,得到共表达基因 609 个。共表达基因功能注释主要富集在大分子分解代谢过程(GO:0043632)、蛋白质氨基

酸去磷酸化(GO:0006470)、调节细胞蛋白质代谢过程(GO:0032268)、翻译调控(GO:0006417)、基因表达转录后调控(GO:0010608)、细胞大分子分解代谢过程(GO:0044265)、丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性(GO:0004722)、磷酸蛋白磷酸酶活性(GO:0004721)、水解酶活性(GO:0016799)、磷酸酯水解酶活性(GO:0042578)(图 3 - A)。KEGG 富集 40 个代谢通路,包括泛素介导的蛋白质水解,甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸代谢,异喹啉生物碱的生物合成,内质网中的蛋白质加工,萜萜烷、嘧啶和吡啶生物碱的生物合成,鞘糖脂生物合成,糖胺聚糖降解,生物素代谢,角质、蜡质的生物合成,氮代谢,脂肪酸合成与代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生

物合成等多种物质代谢过程(图 3 - B)。

2.4 水稻 *OsRIP8* 基因启动子元件

在水稻 *OsRIP8* 基因启动子区域,除存在 RNA 聚合酶结合位点 TATA - box、CAAT - box 等基本调控元件外,还存在与植物生长发育相关的其他元件,如胚乳特异性元件、分生组织特异性元件,与胁迫相

关的干旱诱导元件、光诱导元件,还有一些激素响应元件,如生长素响应元件、脱落酸响应元件(表 2)。从 *OsRIP8* 基因启动子区域具有的顺式作用元件种类和数量推测,*OsRIP8* 基因的表达可能受光、激素、胁迫的诱导,且参与植物器官的生长与发育。

表 2 *OsRIP8* 基因启动子元件

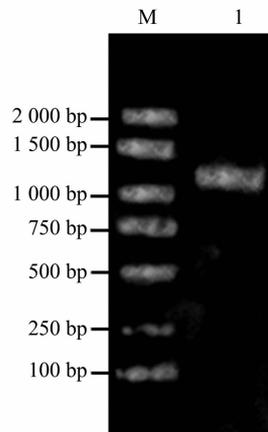
类型	名称	功能	数量(个)
植物生长发育	TATA - box	核心启动子元件	20
	CCAAT - box	MYBHv1 结合位点	1
	CAT - box	分生组织特异性元件	2
	CAAT - box	启动子和增强子区域常见元件	14
	GCN4 - motif	胚乳特异性元件	1
	O2 - site	玉米醇溶蛋白代谢调节元件	2
	Circadian	昼夜节律控制元件	1
	NON - box	分生组织特异性激活	1
	非生物胁迫与生物胁迫	MBS	MYB 结合位点参与干旱诱导
Box 4		光响应元件	1
G - box		光响应元件	3
Sp1		光敏元件	1
AE - box		用于光响模块的一部分	1
GATA - motif		光敏元件	1
chs - CMA2a		光响应元件的一部分	1
CAG - motif		光响应元件的一部分	1
ACE		光响应元件	1
植物激素响应	TGA - element	生长素响应元件	2
	ABRE	脱落酸响应元件	2
	TGACG - motif	茉莉酸甲酯(MeJA)响应元件	2
	CGTCA - motif	MeJA 响应元件	2
	P - box	赤霉素响应元件	1
	TATC - box	赤霉素响应元件	1

2.5 水稻 *OsRIP8* 基因的克隆

从粳稻品种中花 11 号中提取总 RNA,经反转录得到 cDNA,用于基因克隆。设计克隆引物,以 cDNA 为模板对 *OsRIP8* 进行扩增,扩增产物经电泳检测,获得与预期大小(1 059 bp)一致的特异性条带。纯化回收 PCR 产物进行 TA 克隆(图 4),挑选单菌落测序,测序结果与密歇根州立大学水稻基因组注释项目(MSU - RGAP)公布的 *OsRIP8* 的 CDS 完全一致,确定扩增产物就是目的基因 *OsRIP8*。

2.6 水稻 *OsRIP8* 基因的表达谱验证

以芯片表达数据分析结果来看,*OsRIP8* 表现为幼穗优先表达模式(图 5 - A)。为验证其表达模式,取抽穗前 1 d 的根、茎、剑叶;P3 ~ P8 期(1 mm 长

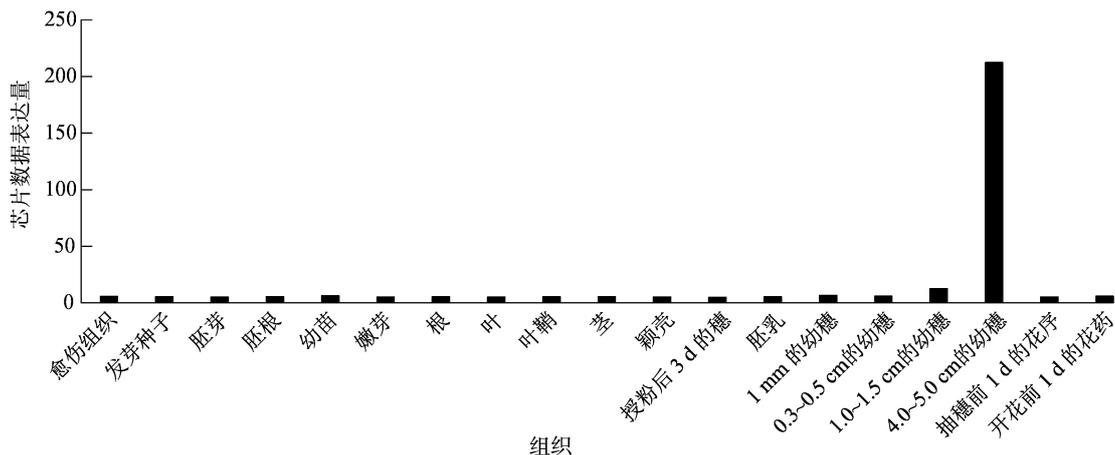


M—DL 2000 DNA marker; 1—*OsRIP8* CDS 连 T 载体产物

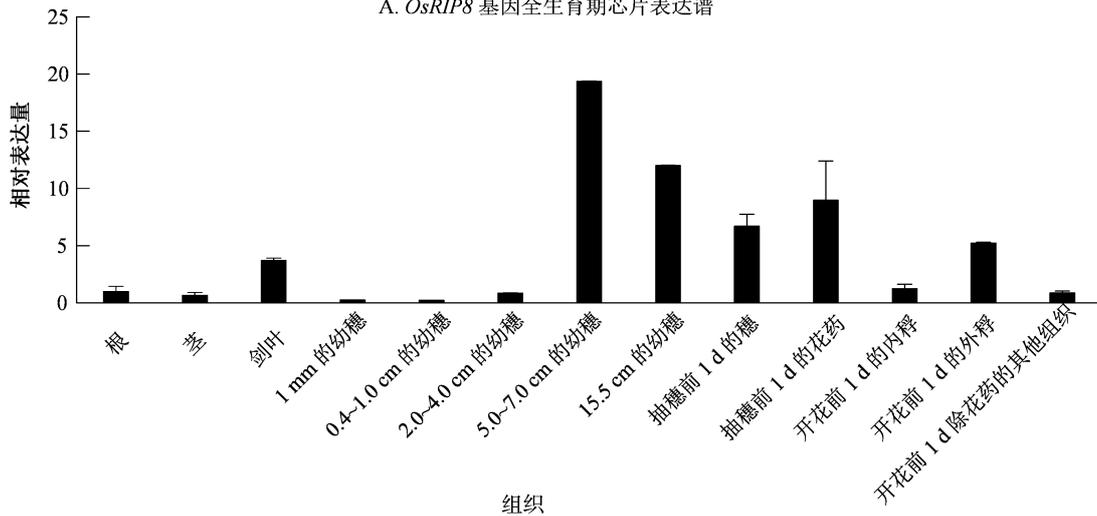
图 4 *OsRIP8* 基因的克隆

到抽穗前)的小穗;抽穗前 1 d 的花药;开花前 1 d 的内外稃;开花前 1 d 除去花药的其他组织。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行表达量检测,

结果表明 *OsRIP8* 在 P6(花粉母细胞减数分裂期)到 P8(花粉完熟期)期的小穗以及开花前 1 d 的花药中表达量较高(图 5-B),和芯片数据一致。



A. *OsRIP8* 基因全生育期芯片表达谱



B. *OsRIP8* 基因 qRT-PCR 表达谱验证

图5 *OsRIP8* 表达谱验证

2.7 *OsRIP8* - RNAi T₁ 代转基因植株的获得和表型分析

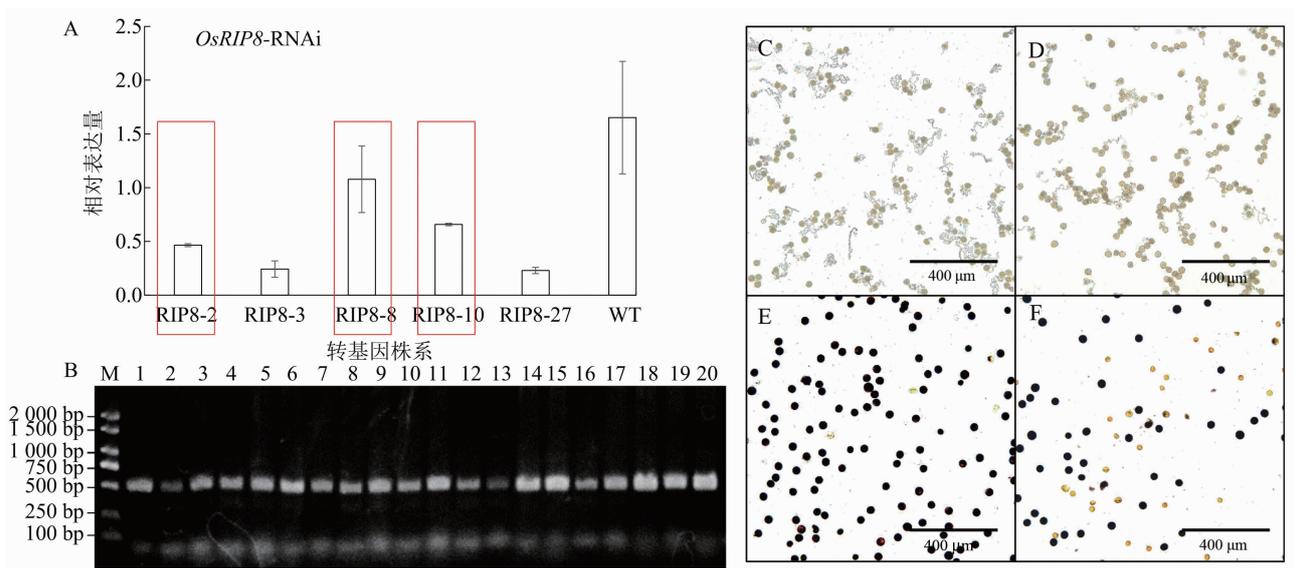
通过 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 寻找 *OsRIP8* 基因的特异片段, 以此设计 *OsRIP8* 基因的 RNAi 引物(表 1), 以中花 11(ZH11) 的 P6 期小穗 cDNA 为模板, PCR 扩增出相应片段, 大小为 447 bp, 采用 *Spe* I / *Sac* I 和 *Kpn* I / *Bam* H I 双酶切的方法将获得的片段连接到 RNAi 载体 pDS1301 上, 构建好的 RNAi 载体采用农杆菌介导的遗传转化方法转化 ZH11 种子诱导的愈伤组织, 得到 *OsRIP8* 的 RNAi 转基因植株 11 株。通过潮霉素进行筛选, 获得独立的 T₀ 代转基因阳性植株 9 株。荧光定量 PCR 检测其干涉效率。最后, 选择转基因阳性单株中表达量低、中、高 3 个层次

行传代种植(图 6-A)。

选取 T₀ 代株系中的 RIP8-2、RIP8-8、RIP8-10 在华中农业大学实验基地进行加代种植, 对 T₁ 代不同株系进行阳性检测(图 6-B), 对纯合家系进行农艺性状的考察。发现 *OsRIP8* - RNAi T₁ 代转基因植株在营养生长阶段与野生型相比无明显异常, 而碘染的结果表明其成熟花粉育性与野生型相比明显下降, 在成熟花粉萌发正常的情况下(图 6-C 至图 6-F), 其结实率与对照相比极显著降低(表 3)。

3 讨论

尽管关于 RIPs 的研究早在 20 世纪 90 年代就有报道, 当时大多是分离出表达量很高的一些毒蛋白例如蓖麻毒蛋白^[22], 后来随着全基因组测序和生物信



A—*OsRIP8* 干涉转基因植株 T_0 代表达量检测；B—*OsRIP8*-RNAi 单株的阳性检测，M 为 DL 2000 DNA marker，1~20 为 T_1 代转基因株系；C~D—WT 和 *OsRIP8*-RNAi 家系成熟花粉粒萌发试验；E~F—WT 和 *OsRIP8*-RNAi 家系成熟花粉粒碘化钾染色

图6 *OsRIP8* 干涉转基因植株表达量检测及表型分析

表3 WT 和 *OsRIP8* - RNAi 家系植株花粉育性和结实率统计

植株	花粉育性 (%)	结实率 (%)
ZH11	94.67 ± 0.04	86.85 ± 0.12
<i>OsRIP8</i> - RNAi T_1 代株系		
<i>OsRIP8</i> - 2	84.63 ± 2.41	36.88 ± 3.00 **
<i>OsRIP8</i> - 8	83.04 ± 0.78 *	52.25 ± 0.83 **
<i>OsRIP8</i> - 10	57.25 ± 4.12 **	43.89 ± 3.12 **

注：*、** 分别表示对照 ZH11 相比差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。

息学技术的发展,很多无法被直接纯化的 RIPs 被鉴定出来,其中就包括水稻全基因组中的 RIPs^[18-19]。水稻中 *OsRIP1*、*OsRIP18* 和 *nuRIP* 等 3 个基因曾有功能分析报道,除此之外绝大多数水稻 *RIPs* 基因的功能仍不清楚。本研究在对水稻 *RIPs* 基因家族进行表达分析时发现该家族基因 *OsRIP8* 在水稻幼穗中优先表达,对其进行进一步的生物信息学分析和初步的功能分析。结果表明,*OsRIP8* 在花粉母细胞减数分裂期的小穗中表达量最高,该基因表达下调导致花粉育性降低,结实率下降,推测该基因参与水稻生殖发育。

OsRIP8 蛋白不含信号肽,这种没有信号肽的 *RIPs* 基因很可能定位于植物核糖体附近的细胞质中^[23]。*OsRIP8* 蛋白属于亲水蛋白且不含完整的跨膜结构域,推测其不参与物质的跨膜运输。GO 及 KEGG 富集分析结果表明,*OsRIP8* 的共表达基因主要富集在大分子分解代谢、蛋白质代谢过程的调

节,参与调控磷酸酶、磷酸酯水解酶活性,参与转录后调控和翻译调控;主要富集的代谢通路包含蛋白质水解、各种氨基酸代谢、各类生物碱、鞘糖脂、角质和蜡质的生物合成。推测 *OsRIP8* 共表达基因可能参与翻译和转录后调控以及酶活调节来控制各类大分子的代谢及生物合成。在水稻 *OsRIP8* 基因启动子区域包括与植物生长发育有关的元件,如胚乳特异性元件、分生组织特异性元件、昼夜节律控制元件;与胁迫有关的干旱诱导元件、光诱导元件;还有一些激素响应元件,如生长素响应元件、脱落酸响应元件、赤霉素响应元件等。赤霉素和光周期是植物花期调控中的 2 条通路^[24],结合 *OsRIP8* 基因表达模式,推测该基因受光、激素、胁迫的诱导,参与植物花期调控及植物的生长与发育。*OsRIP8* - RNAi T_1 代株系可育花粉比例在 57.25% ~ 84.63% 之间且萌发正常,但相应的结实率却在 36.88% ~ 52.25% 之间,且在其启动子区域发现了和胚乳发育有关的元件 GCN4 - motif 及 O2 - site,因此推测 *OsRIP8* 基因除了影响花粉发育外可能也参与雌配子或者胚乳的发育。GCN4 - motif 是一种在谷作物种子贮藏蛋白启动子中高度保守的顺式元件,对控制醇溶蛋白和谷蛋白的胚乳特异性表达起着核心作用^[25-26]。本研究只涉及试验材料的创建和初步的表型观察,该基因在水稻生殖发育中的具体功能和机制还有赖于更多遗传材料的创建和进一步研究。下一步将补充 CRISPR/cas9 突变体植株及超表达植

株,对这些转基因植株在小穗和胚乳发育时期分别进行干旱、光和激素诱导处理,对其花粉、胚囊和胚乳发育及花期等性状进行对比,进一步明确 *OsRIP8* 在水稻生殖发育中的功能。

4 结论

OsRIP8 基因在花粉母细胞减数分裂期到花粉完熟期的小穗中高表达;*OsRIP8* 的表达下调造成植株花粉育性和结实率降低。暗示该基因对水稻小穗的发育具有重要作用,可能受光、激素、胁迫的诱导参与调控水稻生殖发育过程。

参考文献:

[1] Stirpe F, Battelli M G. Ribosome - inactivating proteins: progress and problems[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63 (16) : 1850 - 1866.

[2] Nielsen K, Boston R S. Ribosome - inactivating proteins: a plant perspective [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52: 785 - 816.

[3] Stirpe F, Barbieri L, Battelli M G, et al. Ribosome - inactivating proteins from plants: present status and future prospects [J]. Bio/Technology, 1992, 10(4) : 405 - 412.

[4] Girbes T, Ferreras J, Arias F, et al. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome - inactivating proteins in plants, fungi and bacteria [J]. Mini - Reviews in Medicinal Chemistry, 2004, 4(5) : 461 - 476.

[5] de Virgilio M, Lombardi A, Caliendo R, et al. Ribosome - inactivating proteins: from plant defense to tumor attack [J]. Toxins, 2010, 2(11) : 2699 - 2737.

[6] Puri M, Kaur I, Perugini M A, et al. Ribosome - inactivating proteins: current status and biomedical applications [J]. Drug Discovery Today, 2012, 17(13/14) : 774 - 783.

[7] Stirpe F. Ribosome - inactivating proteins [J]. Toxicon, 2004, 44 (4) : 371 - 383.

[8] Puri M, Kaur I, Kanwar R K, et al. Ribosome inactivating proteins (RIPs) from *Momordica charantia* for anti viral therapy [J]. Current Molecular Medicine, 2009, 9(9) : 1080 - 1094.

[9] Wang P E, Turner N E. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins [J]. Advances in Virus Research, 2000, 55 : 325 - 355.

[10] Choudhary N, Kapoor H C, Lodha M L. Cloning and expression of antiviral/ribosome - inactivating protein from *Bougainvillea xbuttiana* [J]. Journal of Biosciences, 2008, 33(1) : 91 - 101.

[11] Huang M X, Hou P, Wei Q, et al. A ribosome - inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco [J]. Plant Growth Regulation, 2008, 54(2) : 115 - 123.

[12] Krishnan R, McDonald K A, Dandekar A M, et al. Expression of recombinant trichosanthin, a ribosome - inactivating protein, in

transgenic tobacco [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 97 (1) : 69 - 88.

[13] Qian Q A, Huang L, Yi R, et al. Enhanced resistance to blast fungus in rice (*Oryza sativa* L.) by expressing the ribosome - inactivating protein alpha - momorcharin [J]. Plant Science, 2014, 217/218 : 1 - 7.

[14] Kim J K, Jang I C, Wu R, et al. Co - expression of a modified maize ribosome - inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight [J]. Transgenic Research, 2003, 12(4) : 475 - 484.

[15] Jiang S Y, Bhalla R, Ramamoorthy R, et al. Over - expression of *OsRIP8* increases drought and salt tolerance in transgenic rice plants [J]. Transgenic Research, 2012, 21(4) : 785 - 795.

[16] de Zaeytjyd J, Chen P Y, Scheys F, et al. Involvement of OsRIP1, a ribosome - inactivating protein from rice, in plant defense against *Nilaparvata lugens* [J]. Phytochemistry, 2020, 170 : 112190.

[17] Wytync P, Lambin J, Chen S M, et al. Effect of RIP overexpression on abiotic stress tolerance and development of rice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3) : 1434.

[18] Jiang S Y, Ramamoorthy R, Bhalla R, et al. Genome - wide survey of the RIP domain family in *Oryza sativa* and their expression profiles under various abiotic and biotic stresses [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67(6) : 603 - 614.

[19] Wytync P, Rougé P, van Damme E J. Genome - wide screening of *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *indica* reveals a complex family of proteins with ribosome - inactivating protein domains [J]. Phytochemistry, 2017, 143 : 87 - 97.

[20] Wu C Y, Li X J, Yuan W Y, et al. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome [J]. The Plant Journal, 2003, 35(3) : 418 - 427.

[21] Hills P N, van Staden J. An improved DNA extraction procedure for plant tissues with a high phenolic content [J]. South African Journal of Botany, 2002, 68(4) : 549 - 550.

[22] Barbieri L, Battelli M G, Stirpe F. Ribosome - inactivating proteins from plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1154(3/4) : 237 - 282.

[23] de Zaeytjyd J, Rougé P, Smagghe G, et al. Structure and activity of a cytosolic ribosome - inactivating protein from rice [J]. Toxins, 2019, 11(6) : 325.

[24] Michaels S D, Amasino R M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering [J]. The Plant Cell, 1999, 11(5) : 949 - 956.

[25] Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F. A 45 - bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm - specific expression of the rice storage protein glutelin gene, *GluA - 3* [J]. FEBS Letters, 1996, 383(3) : 213 - 218.

[26] Wu C Y, Washida H, Onodera Y, et al. Quantitative nature of the Prolamin - box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis* - element requirements for endosperm - specific gene expression [J]. The Plant Journal, 2000, 23(3) : 415 - 421.