

一个水稻 *OsWNK* 基因的分离及表达分析

王小兰¹, 刘顺枝¹, 何光存², 田长恩^{1*}

(1. 广州大学 生命科学学院 植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室, 广州 510006;

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

摘要: 在褐飞虱取食后的水稻 cDNA 差减文库中筛选到与拟南芥 *AtWnk1* 激酶基因高度同源的 EST (GenBank 登录号: BU572310), 以该 EST 为探针, 从褐飞虱取食后的水稻 cDNA 文库中分离到 *OsWnk* 基因的全长 cDNA, 该基因编码一个含 677 个氨基酸残基的蛋白激酶, 与以前克隆出的一种拟南芥蛋白激酶基因 (GenBank 登录号: DQ837532) 只有 3 个氨基酸残基的差异。Northern 杂交结果显示, 在褐飞虱取食后, 该基因的表达上升。表明该激酶基因参与褐飞虱取食的应答反应, 可能与水稻抗褐飞虱有关。

关键词: 褐飞虱; *OsWnk*; cDNA 筛选; 水稻

中图分类号: Q966, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)03-0404-04

Isolation and expression analysis of an *OsWnk* gene in rice

WANG Xiao-Lan¹, LIU Shun-Zhi¹, HE Guang-Cun², TIAN Chang-En^{1*}

(1. Guangzhou Key Laboratory for Functional Studies on Plant Stress-Resistant Genes, School of Life Sciences,

Guangzhou University, Guangzhou, 510006, China; 2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Plant

Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: BPHiw008, an EST (expressed sequence tag) which is highly homologous with *Arabidopsis Wnk1* (with no lysine kinase), has been screened from the rice cDNA SSH library. Using this EST as probe to screen the cDNA library induced by brown planthopper sucking, a full length of cDNA with 2.4 Kb in size was isolated and named as *OsWnk*. *OsWnk* is deduced to encode a 677-amino-acid protein *OsWnk* through BLAST. Only 3 amino-acid residues of *OsWnk* are different from those of *AtWnk1*. Result of RNA gel blot analysis showed that *OsWnk* was up-regulated in brown planthopper-sucked rice, indicating that *OsWnk* may play a role in resistance to brown planthopper of rice.

Key words: brown planthopper; *OsWnk*; cDNA screening; rice

褐飞虱 (brown planthopper) 是一种严重的农业害虫, 常引起水稻减产甚至绝收 (杨长举等, 1999)。随着环保意识的增强及对褐飞虱防治方法的拓展, 人们正在减少杀虫剂的用量, 把更多的精力放在培育抗虫水稻新品种和通过遗传工程手段提高水稻的抗性方面, 并取得了一定的效果。但培育出的某些水稻新品种往往只在 2~3 年内对褐飞虱表

现出较好的抗性, 之后就会逐渐被褐飞虱适应, 从而成为褐飞虱危害的新对象。要有效地解决这个问题, 了解褐飞虱与水稻的互作机理是非常必要的。蛋白激酶是一类胞内信使依赖的、在蛋白质磷酸化过程中起中介和放大作用并帮助完成信号传递过程的酶, 广泛存在于植物和其他生物体内 (Hanks, 1991)。植物中的蛋白激酶广泛参与了植物的抗病

收稿日期: 2008-10-22 修回日期: 2009-02-09

基金项目: 广东省自然科学基金(05006754)[Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(05006754)]

作者简介: 王小兰(1973-), 女, 江西泰和县人, 博士, 主要研究方向为植物遗传学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: changentian@yahoo.com.cn)

与抗逆反应。WNK[with no lysine(K)]激酶是一种丝/苏氨酸蛋白激酶。Xu 等(2000)在研究细胞外信号调节蛋白激酶家族时从大鼠大脑 cDNA 文库中克隆了一种新的哺乳动物丝/苏氨酸蛋白激酶基因,并命名为 WNK1。Verissimo & Jordan(2001)发现人体中也含有一系列与大鼠 WNK1 激酶具有同源催化结构域并具有相同特征的蛋白激酶,并成功克隆到了人的 WNK1, WNK2, WNK3 和 WNK4 基因。

本研究组运用抑制性差减杂交法(SSH)鉴定了 100 多个与水稻抗褐飞虱取食反应相关的差异表达 cDNA 克隆(王小兰等,2005)。其中, BpHiw008(登录号: BU572310)与拟南芥中的一个 WNK 激酶基因 *AtWNK1*(GenBank 登录号: DQ837532)相似性最高,故推测该克隆可能编码水稻中的一个 WNK 激酶。已有的研究表明,哺乳动物中的 WNK 激酶参与调节细胞间的离子转运过程(Gamba, 2005)。而关于植物 WNK 激酶的研究则主要集中在拟南芥,其 WNK 激酶被证明参与昼夜节律的调控以及和 V ATPase C 亚基的互作(Murakami-Kojima 等, 2002; Hong-Hermesdorf 等, 2006)。但是,水稻 WNK 激酶的功能目前还不是很清楚,关于该激酶在植物抗虫等反应中所起作用的研究则未见报道。本研究旨在克隆鉴定水稻中该基因的全长 cDNA 序列,分析其在水稻中的表达特性,为进一步研究其在植物抗虫与抗逆反应中的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 B5 cDNA 文库 褐飞虱 2—3 龄若虫取食 B5 cDNA 文库由王小兰构建(王小兰,2003)。

1.1.2 工具酶及试剂 DNA 序列分析试剂盒以及 [³²P]-dCTP 均购自 Perkin-Elmer 公司。T₃ 和 T₇ 通用引物由上海生物工程公司合成。TRIzol 试剂购自 Gibco 公司。氨基青霉素等均为国产针剂,其它试剂均为分析纯。

1.1.3 水稻材料 选来源于栽培稻与药用野生稻 (*Oryza officinalis* Wall ex Watt)间杂交后代的一个高抗褐飞虱的稳定品系 B5(王小兰,2003)为研究对象。

1.1.4 褐飞虱 实验中所用的褐飞虱均为发育至 2~3 龄的若虫。褐飞虱在武汉大学遗传所台中 1

号饲养繁殖。

1.1.5 探针 以王小兰(2003)构建的 B5 材料抑制消减杂交文库中筛选得到的 BPHiw008 (BU572310)为探针,进行 cDNA 文库的筛选。

1.2 方法

1.2.1 褐飞虱取食 选取发芽良好的抗褐飞虱水稻品系 B5 种子,以每杯 20 粒的密度播种于 10 cm × 10 cm 的塑料杯中。待秧苗长至 3 叶期时,按每株 10 头放入褐飞虱。

1.2.2 总 RNA 分离 三叶期的 B5 在褐飞虱取食 48 h 后,提取总 RNA。总 RNA 采用 TRIzol 试剂,根据试剂盒说明书来提取,取 25 μg 的总 RNA 在 1.2% 甲醛变性胶上电泳 4 h 后检测其完整性。

1.2.3 O₃WNK cDNA 克隆的筛选 用 SSH 筛选得到的抗褐飞虱相关基因 BpHiw008(王小兰, 2003),对噬菌体文库进行原位杂交,放射自显影后,从膜中选出阳性的嗜菌斑区域,取出后进行第二轮杂交,得到可能的纯化的阳性嗜菌斑,溶于 100 μL SM buffer,吸 1 μL 作模板进行 PCR 扩增。对扩增结果为两条带或以上的阳性嗜菌斑,进行第三轮杂交,得到纯化的阳性嗜菌斑。

1.2.4 阳性克隆的体内剪接 用灭菌的牙签挑取阳性嗜菌斑后,再悬浮于 200 μL SM 缓冲液和 20 μL 氯仿中。取 100 μL 阳性嗜菌斑与 100 μL XL1-Blue (OD=1.0)和 0.5 μL 辅助噬菌体(>1 × 10⁶ pfu/μL)在 37 °C 培养 15 min 后,再加入 3 mL LB-培养基继续摇动孵育 3 h,细菌经 70 °C 20 min 灭活,含有 pBluescript 质粒的上清再感染 SOLR 宿主菌,在含氨基青霉素的 LB 固体培养基上,37 °C 培养过夜。挑取单克隆继续在含氨基青霉素的 LB 液体培养基上扩大培养。

1.2.5 Northern blot 提取褐飞虱取食(T)48 h 和未取食(C)的两叶一心时期的 B5 幼苗总 RNA,其提取方法同 1.2.2。BpHiW008 全长 cDNA 的 PCR 产物为探针,进行 Northern 杂交分析,探针标记及杂交方法参照何青等(2005)的方法。

2 结果

2.1 BpHiw008 cDNA 克隆的筛选

以 BpHiw008 EST 作探针,对所构建的褐飞虱诱导的 B5 cDNA 文库进行噬菌体原位杂交筛选,第一轮筛选时每皿储有噬菌体 30 000 个左右,共有 3

张膜,在高强度条件下($1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$, 15 min; $0.5 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$, 15 min)洗膜,从两张重复的膜中挑选均出现的阳性噬菌斑,共有 10 个如图 1 的第一次筛选结果中箭头所示的候选噬菌斑,其杂交信号的强度和密度均大于周围背景的为阳性克隆,用牙签将这区域噬菌体取出后,进行第二、三轮

筛选,每个斑对应一个平皿,每皿储 100 个左右噬菌体,洗膜条件同上,放射自显影结果如图 1 所示。经过三轮原位杂交,将挑选的单个噬斑 PCR 检测,都是一条带,说明经三次筛选后,基本上是纯化的单克隆,且插入片段各不相同,选取插入片段较大的三个阳性克隆,将这些阳性噬菌斑分别挑出后,进行体内



图 1 cDNA 文库的筛选

Fig. 1 Screening of cDNA library

剪切,形成含有 *OsWnk* 基因的大肠杆菌菌落。

2.2 全长 cDNA 的分离

挑取一个长约 2.60 kb 已转化成质粒的 cDNA 片段进行测序,发现这个 cDNA 包含一个由 2031 个碱基编码的 677 氨基酸残基的开放阅读框(图 2)。将此测序产物进行蛋白质数据库(国际生物技术信息中心, BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索,发现与拟南芥 *Wnk1*(DQ837532)存在 99% 的同源性。

2.3 Northern 杂交结果分析

将对照及接虫 B5 水稻植株的 RNA 样品进行电泳分离和转膜后,以 *OsWnk* 为探针进行 Northern 杂交。结果如图 3 示,可以看出在褐飞虱取食后,*OsWnk* 的表达量高于对照,说明 *OsWnk* 可能在水稻对褐飞虱的防卫反应中起作用。

3 讨论

褐飞虱是亚洲最严重的水稻害虫之一,除了对水稻作物产生直接的伤害外,它还是水稻病毒病的传播媒介(杨长举等,1999)。尽管取食植物韧皮部的昆虫多种多样,但是植物抗性反应分子生理及抗性机理信息却相当匮乏。因此,本研究具有重要意义。在长期的进化过程中,植食性昆虫与其宿主形成了相互竞争、相互适应及相互制约的互作机制,植物形成了多种能减轻因昆虫刺激所造成危害的防御

机制。由蛋白激酶所催化的蛋白磷酸化作用在这些防御机制中起着重要作用,蛋白激酶因而广泛参与了植物的抗病与抗逆反应(Shigemitsu 等,2007)。与其它蛋白激酶一样,*Wnk* 也具有激酶活性,且能够自身磷酸化,是生物体内一种重要的信号调节酶,可以被上游信号激活,并调控下游作用底物的活性,是细胞生理过程中的重要调控子(Shigemitsu 等,2007)。我们发现,在抗虫水稻 B5 中,*OsWnk* 基因受褐飞虱取食诱导而表达增强(图 3)。提示该基因的编码产物可能参与水稻对褐飞虱取食所引起的胁迫和损伤的反应,进而可能引发系列反应,基因表达的变化产生直接或间接的抗虫效应。就我们所知,这是第 1 个关于 *OsWnk* 涉及水稻对褐飞虱的反应的报道。至于褐飞虱取食后 *OsWnk* 在信号传递过程中如何起作用或是到底起没起作用还需要进一步研究。

参考文献:

- Gamba G. 2005. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**:245–252
- Hanks SK. 1991. Eukaryotic protein kinases [J]. *Curr Opin Struct Biol*, **1**:369–383
- He Q(何青), Yuan HY(袁红雨). 2005. The construction and screening of suppression subtractive cDNA library of rice seedling exposed to BPH(受褐飞虱取食的水稻幼苗的抑制消减 cDNA 文库的构建及筛选)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(3):237–240
- Hong-Hermesdorf A, Brux A, Gruber A, et al. 2006. WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C[J]. *FEBS Letters*, **580**:932–939

