

农业生物技术

# 普通小麦中一氧化氮相关因子 (TaNOA) 编码基因的克隆和分子生物学分析

郝丽芳<sup>1,2\*</sup>, 余春梅<sup>1,3\*</sup>, 李斌<sup>1,2</sup>, 王道文<sup>1</sup>

1 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 南通大学生命科学学院, 南通 226007

**摘要:** 一氧化氮是动植物体内重要的信号分子。本研究利用同源克隆技术从六倍体普通小麦中获得一个一氧化氮相关因子 (TaNOA) 编码基因的全长基因组和 cDNA 克隆。该基因具有 13 个外显子和 12 个内含子, 与拟南芥以及水稻中同源基因结构相似。根据 cDNA 推导的氨基酸序列与拟南芥 AtNOA1 的序列一致性达 60% 以上, 具备 P-环 GTPase G4-G5-G1-G2-G3 的排列特征和保守的序列。对其中 2 个内含子的测序分析表明在六倍体小麦中 *TaNOA* 至少有 3 个成员。进一步用中国春小麦缺体-四体材料将这 3 个 *TaNOA* 基因成员分别定位在第六同源群的 6A、6B 和 6D 染色体上, 本研究获得的成员定位于 6B 染色体上, 因此将其命名为 *TaNOA-B1*。原生质体表达实验表明, *TaNOA-B1* 可能定位在线粒体中。*TaNOA* 基因在小麦根、叶片中表达较高, 在幼穗和小花中有少量表达, 茎中几乎检测不到表达。*TaNOA* 的转录本水平还因脱落酸或盐处理而上升, 表明它可能参与小麦对非生物胁迫的反应。本研究为进一步克隆六倍体小麦中 *TaNOA* 的其他成员及研究该基因在小麦中的功能奠定了基础。

**关键词:** 普通小麦, 一氧化氮相关因子 (NOA), *TaNOA1-B1*, 防御反应

## Molecular cloning and preliminary analysis of TaNOA in common wheat

Lifang Hao<sup>1,2\*</sup>, Chunmei Yu<sup>1,3\*</sup>, Bin Li<sup>1,2</sup>, and Daowen Wang<sup>1</sup>

1 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 School of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226007, China

**Abstract:** Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule with diverse physiological functions in both animal and plant cells. In this work, we isolated the full-length cDNA and genomic DNA sequences of *TaNOA-B1* encoding a putative NO associated (NOA) factor in common wheat. Bioinformatic analysis showed that *TaNOA-B1* possessed a similar intron/exon structure as its orthologous genes in *Arabidopsis* and rice. The amino acid sequence deduced from *TaNOA-B1* was more than 60% identical to those of *Arabidopsis* and rice NOA1 proteins. The primary structure of *TaNOA-B1* contained the zinc finger and P-loop GTPase motifs

**Received:** September 22, 2009; **Accepted:** October 22, 2009

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB118300).

**Corresponding author:** Daowen Wang. Tel: +86-10-64889380; Fax: +86-10-64854467; E-mail: dwwang@genetics.ac.cn

\*These authors contributed equally to this study.

国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (No. 2009CB118300) 资助。

conserved in *Arabidopsis* and rice NOA1 proteins. There existed at least three NOA gene members in common wheat, which were mapped to homoeologous group six chromosomes 6A, 6B and 6D, respectively. *TaNOA-B1* investigated in this work was located on chromosome 6B. The transcripts of *TaNOA* members were found mainly in leaves. TaNOA-B1-GFP fusion protein may be located in mitochondria. *TaNOA* transcript level was up-regulated by abscisic acid (ABA) or NaCl treatments, indicating that *TaNOA* might be involved in wheat responses to abiotic stresses.

**Keywords:** common wheat, nitric oxide associated (NOA), *TaNOA-B1*, abiotic stress response

一氧化氮 (Nitrite oxide, NO) 作为重要的信号分子参与动物的神经传导、肌肉伸缩、激素分泌、细胞凋亡、离子通路活性以及免疫反应等重要生理过程<sup>[1]</sup>。动物中内源 NO 的合成主要是由一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase, NOS) 催化产生的。在 NADPH 作为电子供体和 O<sub>2</sub> 参与下, NOS 将 L-精氨酸转化为中间产物 N<sup>w</sup>-羟基-L-精氨酸, 最终生成 NO 和 L-瓜氨酸。该反应需要核黄素二核苷酸 (FAD)、核黄素单核苷酸 (FMN)、四氢生物喋呤 (BH<sub>4</sub>) 等辅助因子的参与<sup>[1]</sup>。

植物中有关 NO 的发现和相对滞后。直到 1998 年 Delledonne 等<sup>[2]</sup>和 Durner 等<sup>[3]</sup>报道 NO 在植物防御反应中作为重要的信号分子起作用, NO 在植物中的研究才迅速展开。除了防御反应外, NO 还参与调控植物种子发芽、根系生长、维管束的分化、气孔运动、开花和抗逆反应等过程<sup>[4]</sup>。目前认为有两种途径参与植物内源 NO 的合成。一是通过硝酸还原酶 (Nitrate reductase, NR) 介导的还原途径产生 NO, 但该酶产生 NO 的活性较低。二是认为植物细胞存在类似动物中的 NOS 参与的 NO 合成途径<sup>[1,4]</sup>。一些生理生化分析 (如检测植物提取物中的 NOS 酶活性或外源施加 NO 的前体物质硝普钠检测 NO 在植物中的积累) 表明植物具备 NOS 酶活, 存在类似动物细胞中的 NO 合成途径<sup>[1,4]</sup>。但直到 Chandok 等<sup>[5]</sup>和 Guo 等<sup>[6]</sup>分别首次报道了烟草和拟南芥的 NOS 基因, 在遗传学和分子生物学水平上对植物 NOS 基因的研究才有了突破。但拟南芥 NOS 基因 (*AtNOS1*) 的突变体 *Atrif1* 对膦胺霉素 (Fosmidomycin) 抗性不能通过 NO 得到恢复<sup>[7]</sup>。Zemojtel 等<sup>[8]</sup>分离了 *AtNOS1* 在水稻 (GenBank Accession No. Q6YPG5) 和玉米 (GenBank Accession No. AY110367) 中的同源基因, 并进行原核表达纯化, 体外生化分析却没有检测到这些蛋白

的 NOS 活性。因此, 研究者认为 *AtNOS1* 可能并不直接合成 NO, 但鉴于 *Atnos1* 突变体中 NOS 的活性下降, NO 含量降低等表型, Crawford 等<sup>[9]</sup>将 *AtNOS1* 重新命名为 *AtNOA1*。Vardi 等<sup>[10]</sup>研究硅藻 *Phaeodactylum tricornutum* 中与 *AtNOA1* 同源的基因 *PtNOA* 时也发现过量表达 *PtNOA* 的材料中, NO 的水平是野生型的 1.8~2.4 倍。Li 等<sup>[11]</sup>研究表明, *AtNOA1* 介导的 NO 合成参与 Ca<sup>2+</sup>、G 蛋白和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号通路调节拟南芥叶片气孔的关闭。这些实验表明, 尽管 *AtNOA1* 及其同源基因不直接参与 NO 的合成, 但确实影响植物体内 NO 含量。进一步研究表明 *AtNOA1* 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 细菌中的 YqeH 蛋白同源, 具有 GTPase 的活性, 参与 70S 核糖体的组装<sup>[12-14]</sup>。

由于 NOA 具有 GTPase 活性而且影响植物细胞中 NO 的含量, 研究其编码基因的分子遗传学有助于更深入地了解 NOA 发挥功能的机理。在作物中研究 NOA, 有利于揭示其是否参与重要农艺性状的调控, 为作物遗传改良研究提供信息。到目前为止, 尚未见小麦中有关 NOA 基因的研究报道, 本研究旨在鉴定和分离六倍体普通小麦中的 NOA 基因, 了解其表达特征, 并对其生物学功能做一些探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

栽培品种小偃54, 中国春缺体-四体系材料 (总计21份), 六倍体小麦A组 (乌拉尔图小麦 *Triticum urartu*, AA, 2n = 2x = 14, IE29-1) 和D组 (粗山羊草 *Aegilops tauschii*, DD, 2n = 2x = 14, As67和As91品系) 祖先物种, 四倍体硬粒小麦 (*T. turgidum* ssp. *durum*, AABB, 2n = 4x = 28, Langdon品种), 以上实验材料均由中国科学院遗传与发育生物学研究所植物细胞与染色体国家重点实验室保存。

## 1.2 酶和试剂

LA DNA 聚合酶 (含 GC buffer), dNTPs, 内切酶和 DNA marker 购自大连宝生物公司。T 载体购自 Promega 公司。胶回收试剂盒购自鼎国生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自博大泰克生物技术有限公司。所用其他化学试剂均来自 Amresco 公司。

## 1.3 基因组 DNA 的提取

小偃 54 和中国春缺体-四体材料于 25℃ 培养 2 周后,用 CTAB 方法<sup>[15]</sup>提取基因组总 DNA (Genomic DNA, gDNA)。

## 1.4 RNA 提取及 cDNA 的合成

在温室 (25℃) 培养小偃 54, 分别取 2 周幼苗的根和叶片、孕穗期植株的茎和幼穗以及开花期植株的小花等材料。用 TRIzol® (Invitrogen 公司) 试剂, 按试剂说明手册制备总 RNA。总 cDNA 的合成按 M-MLV 逆转录酶 (Promega 公司) 反转试剂盒说明书进行。

## 1.5 5'-RACE 和 3'-RACE

通过生物信息学分析发现一条小麦表达序列标签 (Expressed sequence tag, EST), 序列编号为 BF201083 (<http://wheat.pw.usda.gov/wEST/>), 与拟南芥 NOA 基因的编码序列具有高度相似性。在此基础上, 设计基因特异引物 (未显示) 进行 5'-RACE 和 3'-RACE。5'-RACE 实验按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 说明书进行。3'-RACE 操作按照 3'-Full Race Core Set (TaKaRa 公司) 说明书进行。

## 1.6 TaNOA 基因的克隆及其全长 cDNA 的获得

根据 1.5 中获得的序列设计了扩增 TaNOA 的全长引物 P1 和 P2 (表 1)。分别以小麦叶片总的基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收, 并进行 T/A 克隆。阳性克隆送 Invitrogen 公司测序。所得的克隆序列为 2 次独立 PCR 和 3 个以上质粒测序的结果。

## 1.7 普通小麦 NOA 基因拷贝数的确定和染色体定位

根据测序结果, 结合生物信息学分析拟南芥、水稻和小麦等物种中 NOA 基因的结构, 设计了在水稻和小麦中保守的跨内含子 (Conserved and intron flanking, CIF, 表 1) 引物分别扩增第 3 内含子 (内

含子长度在拟南芥、水稻和小麦间变化不明显) 和 12 内含子 (在上述 3 个物种间内含子的长度变化较大), 且扩增产物的长度利于毛细管电泳 (介于 100~600 bp)。PCR 产物经过 T/A 克隆后, 阳性克隆随机测序, 根据片段的序列差异推断普通小麦中 NOA 基因的拷贝数。PCR 扩增反应的模板为从小偃 54、IE29-1、As67、As91、Langdon 制备的基因组 DNA 样品。荧光标记引物 CIF P3 与 P4 配对, PCR 产物经过毛细管电泳分离, 在中国春及其缺体-四体材料中对 TaNOA 基因进行染色体定位研究。

## 1.8 半定量 PCR 分析 TaNOA 的表达模式

设计保守引物 TaNOA P3 和 P4, 对 TaNOA 组织器官表达模式进行分析。内参基因为普通小麦  $\beta$ -tubulin (GenBank Accession No. TAU76745) 基因特异引物 (表 1)。

## 1.9 原生质体表达载体的构建和拟南芥原生质体的转化

通过 PCR 扩增、酶切回收和 DNA 连接将得到的 TaNOA-B1 基因的全长 cDNA 克隆到 p163-GFP 载体 (含 35S: GFP 表达框<sup>[16]</sup>) 中 GFP 编码序列的上游, 制备了 35S:TaNOA-B1-GFP 表达载体, 所用引物见表 1, 经测序验证为正确的质粒用于原生质体的转化。温室生长良好的拟南芥野生型 (Columbia ecotype) 叶片用于制备原生质体和转化<sup>[17]</sup>。转化后的原生质体于 Olympus FV500 激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

表1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
TaNOA-P1	CAAAGCTTTTCGCTTTCTCC
TaNOA-P2	CCACAGCAACATTTCACCTCG
CIF P1	ATACAATCTGCTGTTCTCTGGAAC
CIF P2	GACTTTGTGGTGCAAGAGA AGG
CIF P3	CAGGAGAGAGCTGAAGGATG
CIF P4	AGTAATGCCACTTG(A)GGTCTC
TaNOA-P3	CCACCACAGAAGCAGATGA
TaNOA-P4	AGTAATGCCACTTG(A)GGTCTC
TaNOA1- Hind III F	CGAAGCTTATGGCGTCGGCGTG
TaNOA1- BamH I R	TGGGATCCGTAATGCCACTTGGG
Ta $\beta$ -tubulin 2 F	GTGCATGGTTCTTGACAACG
Ta $\beta$ -tubulin 2 R	CCTTAGGCAGCAGGTGACTC

### 1.10 脱落酸 (ABA) 和盐处理

将常规培养的小麦种子萌发 3 d 的幼苗转入水培体系 (改良的 1/4 Hoaglands 培养液) 中。植株生长 2 周为二叶一心期时, 对其进行相应的胁迫处理。处理方法如下: 将小麦幼苗分别移到含有 20  $\mu\text{mol/L}$  ABA 或 150 mmol/L NaCl 的新鲜 1/4 Hoaglands 培养液中, 处理 4 h 和 10 h 时分别取幼苗的地上部和地下部, 液氮速冻后保存在  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。总 RNA 提取、cDNA 合成以及半定量 RT-PCR 试验参照上述方法进行, 所用 PCR 引物列于表 1。

## 2 结果

### 2.1 TaNOA 基因的 cDNA 和 gDNA 克隆以及基因结构分析

通过生物信息学分析和分子克隆方法, 在普通小麦品种小偃 54 中, 获得了一个具有全长编码区的 NOA 基因的 cDNA 和基因组克隆。通过序列比对分析, 所获得的基因组克隆编码区的序列与所获得的 cDNA 克隆的序列是一致的, 用该 cDNA 5' 特异序列的亚基因组表达模式分析表明, 只在含有 B 亚基因组的四倍体和六倍体小麦中表达 (结果未显示), 结合 2.2 结果, 将该基因命名为 *TaNOA-B1*。比较拟南芥和水稻 NOA 以及 *TaNOA-B1* 的基因结构, 发现 3 个物种中 NOA 的结构非常保守, 均由 13 个外显子和 12 个内含子组成 (图 1A)。基因在物种间长度上的差异主要是内含子长度上的变化。

*TaNOA-B1* 与 *AtNOA1* 的序列一致性达到了 61%, 与 *OsNOA* 序列一致性达到了 82%。进一步分析表明, *TaNOA-B1* 具有典型的 P-环 GTPase 酶的特点, 即具有 G4-G5-G1-G2-G3 倒置排列的 GTP 结合基序 (图 1B)<sup>[10,12-13,17]</sup>; 在 N 端具有  $\text{CX}_2\text{CX}_{25-35}\text{CX}_2\text{C}$  锌指结合基序 (图 1B), 表明 *TaNOA-B1* 及其同源蛋白可能是一类能与核酸结合的蛋白。氨基酸序列显示出的特征表明 *TaNOA-B1* 应该具有生物学功能。

### 2.2 六倍体普通小麦 NOA 基因拷贝数的分析和染色体定位

为了明确六倍体普通小麦中 NOA 基因的拷贝数, 根据图 1A 基因结构的特点设计引物, 利用 PCR

分别扩增跨 NOA 内含子-3 (CIF P1和P2配对) 和内含子-12 (CIF P3和P4配对) 的区域, 并进行测序分析 (材料与方法 1.7)。结果显示小偃 54 中 NOA 基因 intron-3 和 intron-12 的序列均可分为 3 种类型 (表 2)。

对跨 intron-12 的 3 种序列分析表明, intron-12-1 与 A 组供体材料 IE29-1 (序列结果未显示) 中扩增的序列一致, 第 2 类序列 (intron-12-2) 与本研究获得的全长 NOA 的 gDNA 序列中内含子-12 一致 (489 bp), 而第 3 类序列 intron-12-3 与从 D 组供体材料 (As67 和 As91) 扩增的序列一致 (结果未显示)。利用跨内含子 12 的荧光标记的引物扩增 A 组供体乌拉尔图小麦 (*T. urartu*, IE29-1), D 组供体粗山羊草 (*Ae. Tauschii*, As67 和 As91), 四倍体硬粒小麦 (*T. turgidum* ssp. *durum*, Langdon), 结合毛细管电泳的方法对片段的类型进行分析。结果表明在二倍体供体物种 (A 和 D 组)、四倍体中分别有 1 种和 2 种片段 (图 2A)。利用该引物扩增中国春及其缺体-四体材料, 并进行片段分析。结果表明缺少 6A、6B 和 6D 染色体的材料中分别缺少了 540 bp、489 bp 和 544 bp 的条带 (图 2B), 而其余材料中的带型与野生型中国春 (CS) 没有区别 (结果未显示)。结合测序以及染色体定位结果, 表明在六倍体小麦中, NOA 有 3 个成员, 分别位于 6A、6B 和 6D 染色体上, 本研究中获得的全长 NOA 序列来自 6B 染色体, 因此将其命名为 *TaNOA-B1*。

### 2.3 TaNOA 的组织器官转录模式分析

根据 *TaNOA-B1* 以及 EST 克隆 (结果未显示) 的序列, 设计保守引物扩增 3 个 *TaNOA* 成员 (表 1), 且为了避免基因组 DNA 污染, 设计的引物扩增产生的 PCR 片段覆盖了 2 个内含子片段。从图 3 中可以看出, *TaNOA* 转录本水平在根和叶片中表达量比较高, 在茎中几乎检测不到, 在生殖器官 (幼穗和花) 中相对较低。

### 2.4 TaNOA-B1 蛋白的亚细胞定位

为了研究 *TaNOA-B1* 蛋白的亚细胞定位, 构建了其与 GFP 的融合蛋白的表达框, 转化拟南芥叶片的原生质体, 通过这种瞬时表达体系获得 *TaNOA-B1* 的亚细胞定位信息。从图 4A 可以看出 *TaNOA-B1*



图1 拟南芥 (*AtNOA1*)、水稻 (*OsNOA*) 和普通小麦 (*TaNOA-B1*) *NOA*基因结构以及氨基酸序列的多重比对分析

Fig. 1 Structure of *Arabidopsis*, rice, and common wheat *NOA* genes and the multiple alignment of the deduced amino acid sequences of three *NOA* proteins. (A) The structure of *NOA* genes from *Arabidopsis* (*AtNOA*), rice (*OsNOA*), and common wheat (*TaNOA-B1*). (B) Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of three plant *NOA* proteins. The conserved zinc finger motif (CX<sub>2</sub>CX<sub>25-35</sub>CX<sub>2</sub>C) is underlined. The sequence elements forming the conserved P-loop GTPase motif are boxed. Asterisks mark the presence of identical residues among the compared proteins. The conserved and semi-conserved substitutions are indicated by the symbols “:” and “.”, respectively.

-GFP 融合蛋白在拟南芥原生质体中呈小点状分布，而叶绿体呈较大的片状分布 (图 4B)，利用荧光显微镜同时观察两种荧光的图像发现融合蛋白多分布在叶绿体的周围，但两者并不重合 (图 4D)。

TaNOA-B1-GFP 融合蛋白的这种分布特征与线粒体的定位非常相似。因此，TaNOA-B1-GFP 融合蛋白不定位于叶绿体。根据线粒体的分布特征，推测 TaNOA-B1 很有可能定位在线粒体中。



图2 祖先物种和六倍体小麦中NOA成员数以及其染色体定位分析

Fig. 2 *NOA* copy number in ancestral species of common wheat and chromosomal assignment of *TaNOA* genes in hexaploid wheat. The fragments specific for individual *NOA* gene members were amplified by PCR, followed by separation via capillary electrophoresis. *NOA* gene specific peaks are marked by arrows. The minor peaks labeled by asterisks are due to DNA size standards. The scale on the horizontal axis indicates fragment size (number of nucleotides), which was determined using the DNA size standards co-separated with the PCR products. The genotypes used in this analysis are provided in the brackets. The data shown are representative of five independent experiments. (A) Analysis of *NOA* copy number in the ancestral species (*T. urartu*, *Ae. tauschii*, *T. turgidum* ssp. *durum*) of common wheat by fragment analysis. (B) Chromosomal assignment of *TaNOA* genes in hexaploid wheat. The templates for PCR were prepared from Chinese Spring (CS), the nulli-tetrasomic (NT) lines of CS. Compared to the presence of all three *NOA* specific fragments in CS, the fragments were specifically absent from the NT lines lacking chromosomes 6A (N6AT6B), 6B (N6BT6A), 6D (N6DT6A). The three *NOA* specific fragments were all amplified in the NT lines lacking other groups (i.e. 1, 2, 3, 4, 5 and 7) of chromosomes (data not shown).

## 2.5 对 ABA 和盐处理的反应

有研究表明在面临外界的环境胁迫时,小麦中的 NOS 活性有被诱导上调的现象<sup>[18]</sup>,说明 NOS 可能参与了小麦对逆境的应答反应。为了明确本研究中分离的 *TaNOA* 基因成员是否参与小麦抗逆过程,对经过 20  $\mu\text{mol/L}$  ABA 或 150  $\text{mmol/L}$  NaCl 处理的小麦幼

苗中 *TaNOA* 基因转录本水平变化进行了分析 (图 5)。在 ABA 处理条件下, *TaNOA* 的转录本水平在地上和地下部分组织中都有比较明显的上调。用 150  $\text{mmol/L}$  NaCl 处理 10 h 后,其转录本略有升高。以上结果表明 *TaNOA* 基因成员的转录本明显地受 ABA 处理诱导,盐处理对其转录水平也有一定的上调作用。

表2 跨内含子-3或内含子-12 PCR片段的多态类型  
Table 2 Polymorphic types of the PCR fragments spanning introns-3 or introns-12

Types	Number of PCR clone	Spanning intron
Intron-3-1	5	3
Intron-3-2	14	
Intron-3-3	4	
Intron-12-1	6	12
Intron-12-2	21	
Intron-12-3	3	

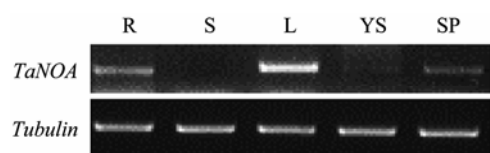


图3 普通小麦中TaNOA成员在不同的器官中的转录模式分析

Fig.3 Transcriptional pattern analysis of TaNOA in different organs of common wheat (*T. aestivum*). Transcripts were amplified using gene specific primers, with the PCR products separated using 1% agarose gel. Equal loading was maintained for all samples. The amplification of wheat tubulin transcripts served as an internal control. R: root; S: stem; L: leaf; YS: young spike; SP: spikelet.

### 3 讨论

#### 3.1 六倍体小麦基因组TaNOA成员数

小麦的基因组比较复杂，大约是水稻基因组的40倍，拟南芥基因组的100倍，基因组中有80%以上的重复序列<sup>[19-20]</sup>。对小麦基因组进行的大规模EST测序并对其中一些EST进行染色体定位，再通过与水稻、大麦、高粱以及短柄草等禾本科植物基因组的比较获得小麦基因组基因分布、排序的规律，

加深了研究者对小麦基因组的了解，为开展小麦基因组的研究奠定了基础。由于目前尚无小麦全基因组序列信息，无法深入了解特定基因在基因组中分布和组成。本研究通过查询小麦EST数据库，获得与水稻、拟南芥NOA1相似性很高的小麦EST序列(BF201083)，在此基础上通过分子生物学的手段获得TaNOA-B1 cDNA及其对应的基因组序列。比较TaNOA-B1和OsNOA(Os02g0104700)基因结构，设计两对保守的跨内含子的引物，通过基因组PCR、克隆和测序后的序列多态性分析(表2)，确定了小麦基因组中至少存在3个NOA成员，结合基于毛细管电泳的片段分析将这3个成员定位在6A、6B和6D染色体上(图2)。前人用BF201083做探针针对六倍体小麦进行Southern杂交分析时发现3条杂交条带，分别定位于6AS、6DS染色体上([http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map\\_locus.cgi?](http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi?))。综合前人与本论文的实验结果，推测NOA在六倍体小麦中具有3个成员，分别定位于6A、6B和6D染色体上。

#### 3.2 TaNOA-B1定位于线粒体

原生质体瞬时表达试验初步表明，TaNOA-B1-GFP融合蛋白的绿色荧光不与叶绿体的红色信号重叠，表明TaNOA-B1-GFP融合蛋白不定位在叶绿体中。从其荧光信号的分布，推测可能是在线粒体中，但确切的分布尚需要进一步的实验进行验证。TaNOA-B1的同源蛋白PtNOA定位在叶绿体中<sup>[10]</sup>。Guo等<sup>[21]</sup>的实验表明，AtNOA1-GFP融合蛋白定位于线粒体中。但Flores-Pérez等<sup>[7]</sup>用AtRIF-GFP

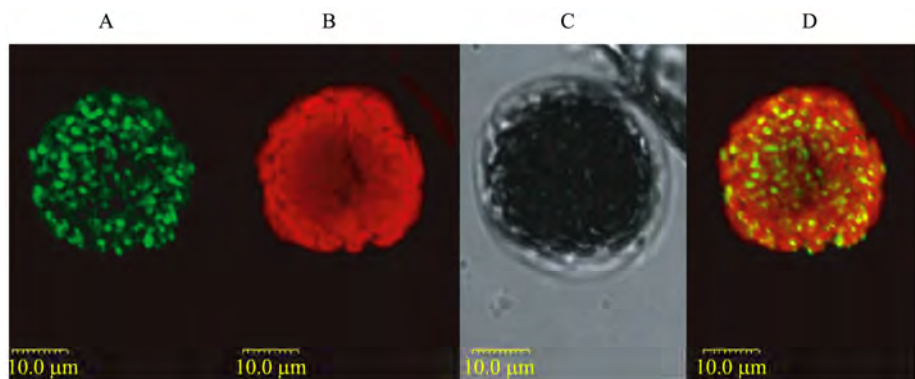


图4 TaNOA-B1-GFP融合蛋白在拟南芥原生质体中的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of TaNOA-B1-GFP fusion protein. (A) GFP signal detected in the protoplast. (B) Background autofluorescence of chloroplasts. (C) Bright-field image of the same protoplast shown in (A) and (B). (D) A merged image of (A) and (B) showing the different localization patterns of TaNOA-B1-GFP fusion protein and chloroplasts. Bar = 10 μm.

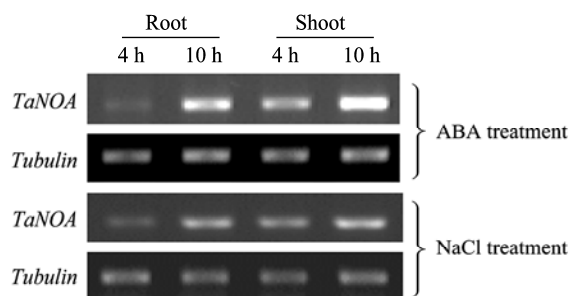


图5 在20 mmol/L ABA ABA和150 mmol/L NaCl分别处理4 h和10 h后TaNOA转录模式的分析

Fig. 5 Transcriptional pattern analysis of TaNOA genes in the wheat seedling treated with 20 mmol/L ABA or 150 mmol/L NaCl after 4 h and 10 h.

转化Atnos1的等位突变体Atrif1, 发现GFP荧光定位在叶绿体中。目前报道的NOA定位试验均是利用转基因技术进行的, 将来需要寻找能检测野生型植物中NOA亚细胞定位的方法, 以便确切地了解NOA发挥功能的部位。

### 3.3 TaNOA 可能参与小麦对逆境的响应

在ABA处理条件下, 植物内源的NO增加, 促进气孔的关闭, 而气孔的运动调节植物与外界的水分以及气体交换<sup>[22]</sup>, 影响植物内部生理生化代谢。而在盐胁迫条件下, 内源NO的变化, 在不同的植物中有不同的结果。Zhao等<sup>[23]</sup>的研究结果表明, 在盐胁迫条件, 拟南芥内源的NO降低, NOS的活性下降。而Valderrama等<sup>[24]</sup>的研究表明, 橄榄树叶片在盐胁迫条件下, NO和NOS的活性均上升。本实验中, 在ABA和NaCl处理时, TaNOA的转录水平平均上升, 是否意味着小麦叶片中的NO含量上升, 并进而通过NO参与小麦对逆境的响应, 需要进一步的实验进行验证。

总之, 本研究对普通小麦NOA成员的数目和染色体定位、表达模式以及其可能发挥的功能做了初步的探索, 进一步的实验尚需对其他两个成员(TaNOA-AI和DI) 进行克隆和研究, 以便了解不同的成员是否在功能上有分化, 相关实验正在进行中。

## REFERENCES

- [1] Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, *et al.* Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**(4): 177–183.
- [2] Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, *et al.* Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998, **394**: 585–588.
- [3] Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(17): 10328–10333.
- [4] Gas E, Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, *et al.* Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *Plant Cell*, 2009, **21**(1): 18–23.
- [5] Chandok MR, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, *et al.* The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 2003, **113**(4): 469–482.
- [6] Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 2003, **302**(5642): 100–103.
- [7] Flores-Pérez U, Sauret-Güeto S, Gas E, *et al.* A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *Plant Cell*, 2008, **20**(5): 303–1315.
- [8] Zemojtel TA, Frohlich MC, Palmieri M, *et al.* Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci*, 2006, **11**(11): 524–525.
- [9] Crawford NM, Galli M, Tischner R, *et al.* Response to Zemojtel *et al.* plant nitric oxide synthase: back to square one, *Trends Plant Sci*, 2006, **11**(11): 526–527.
- [10] Vardi A, Bidle KD, Kwityn C, *et al.* A diatom gene regulating nitric-oxide signaling and susceptibility to diatom-derived aldehydes. *Curr Biol*, 2008, **18**(12): 895–839.
- [11] Li JH, Liu YQ, Lü P, *et al.* A signaling pathway linking nitric oxide production to heterotrimeric G protein and hydrogen peroxide regulates extracellular calmodulin induction of stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2009, **150**(1): 114–124.
- [12] Moreau M, Lee GI, Wang Y, *et al.* AtNOS/AtNOA1 is a functional Arabidopsis thaliana cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2008, **283**(47): 32957–32967.
- [13] Sudhamsu J, Lee GI, Klessig DF, *et al.* The structure of YqeH: an AtNOS1/AtNOA1 ortholog that couples GTP hydrolysis to molecular recognition. *J Biol Chem*, 2008, **283**(47): 32968–32976.
- [14] Uicker WC, Schaefer L, Koenigsknecht M, *et al.* The essential GTPase YqeH is required for proper ribosome

- assembly in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2007, **189**(7): 2926–2929.
- [15] Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, *et al*. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(24): 8014–8018.
- [16] Liu XP, Liu XY, Zhang J, *et al*. Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Res*, 2006, **16**(3): 287–296.
- [17] Yoo SD, Cho YH, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2007, **2**(7): 1565–1572.
- [18] Chen M, Shen WB, Ruan HH, *et al*. Effects of nitric oxide on root growth and its oxidative damage in wheat seedling under salt stress. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2004, **30**(5): 569–576.
- [19] Feuillet C, Keller B. Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Ann Bot (Lond)*, 2002, **89**: 3–10.
- [20] Lazo GR, Chao S, Hummel DD, *et al*. Development of an expressed sequence tag (EST) resource for wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16 000-locus bin-delineated map. *Genetics*, 2004, **168**(2): 585–593.
- [21] Guo FQ, Crawford NM. *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, 2005, **17**(12): 3436–3450.
- [22] Neill S, Barros R, Bright J, *et al*. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot*, 2008, **59**(2): 165–176.
- [23] Zhao MG, Tian QY, Zhang WH. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, **144**(1): 206–217.
- [24] Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, *et al*. Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett*, 2007, **581**(3): 453–461.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 分子生物学（原书第四版）

（生命科学名著）

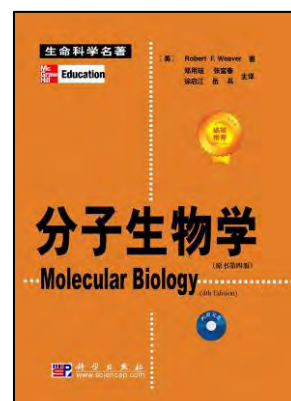
〔美〕Weaver, R.F. 著，郑用琰 等译

978-7-03-299524-4 ¥95.00 2009年12月 出版

### 内容简介

分子生物学是生命科学发展过程中诞生的一门实验性极强的新兴学科。美国著名分子生物学家 Robert F. Weaver 遵循这一学科发展的特点，于 1999 年出版了第一版 *Molecular Biology*。全书以原始研究论文为基础，通过对实验的设计、对结果的分析而逐步展开对分子生物学理论的讲述，文字通俗流畅。随着学科的迅速发展，几经修订再版的 *Molecular Biology* 第四版共有导论，分子生物学方法，原核生物的转录，真核生物的转录，转录后加工，翻译，DNA 复制、重组和转座，以及基因组 8 部分 24 章，书后还附有分子生物学专业词汇表。每一章节都以提出科学问题、展开研究过程开始，以提供思考习题、推荐阅读文献结束，理论讲述逻辑严密，实验过程提炼清晰，特色鲜明，内容详尽，图文并茂，易读易记。

本书是生命科学相关专业的研究生以及从事该方面科研、教学人员不可多得的一本优秀参考书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：李韶文 (010-64000849) 周文字 (010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目