

## Identification and Analysis of a Group of Highly Conserved trs-like Genes in Rice

HU Xin<sup>1</sup>, HU Hao<sup>1</sup>, HONG Guo-Fan<sup>1,2</sup>, HAN Bin<sup>1</sup>,

(1. National Center for Gene Research, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China;

2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** There are at least ten transcriptional trs-like genes in rice that have been confirmed by RT-PCR and sequencing, based on the annotation results of rice genome and homologous search. These ten genes correspond to six of the ten known subunits of TRAPP complex in yeast. Four pairs of them are duplicates while the other two are unique according to the known rice genomic sequences. All of the ten genes are constitutively expressed in rice tissues and share phylogenetic homology to some extent with other eukaryotic trs-like genes in their gene structures and protein sequences.

**Key words:** rice; TRAPP subunits; ER-Golgi tethering; genome annotation; RT-PCR

## 一组高度保守的水稻 trs-like 基因的鉴定与分析

胡欣<sup>1</sup>, 胡昊<sup>1</sup>, 洪国藩<sup>1,2</sup>, 韩斌<sup>1</sup>,

(1. 中国科学院上海生命科学研究院国家基因研究中心, 上海 200233;

2. 中国科学院上海生命科学研究院生化细胞研究所, 上海 200031)

**摘要:** 基于对水稻基因组序列的注解和同源搜索的结果, 用 RT-PCR 结合测序的方法证明了水稻中至少有 10 个具有转录活性的 trs-like 基因。这 10 个基因的编码产物与酵母 TRAPP 蛋白复合体已知 10 个亚基中的 6 个分别同源。其中 4 对基因是双拷贝的, 另 2 个则是单拷贝的(基于已知的水稻基因组序列)。所有这 10 个基因均在不同时期的水稻组织中广泛表达, 并与其他真核生物的 trs-like 基因在基因结构及编码蛋白质序列水平上高度保守。

**关键词:** 水稻; TRAPP 亚基; 内质网-高尔基体转运牵引; 基因组序列注解; 反转录 PCR

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0379-4172(2004)08-0822-08

膜转运(membrane traffic)是细胞内物质运输, 尤其是大分子物质运输的一种重要方式, 因此, 转运小泡的靶向性及其与受体细胞器膜融合的特异性直

接决定着胞内物质运输的有序性。研究发现, 特定的 SNARE(soluble NSF attachment protein receptor, SNARE)复合体桥的形成介导许多细胞内的膜的特

收稿日期: 2003-10-27; 修回日期: 2003-12-26

基金项目: 本研究由中国科技部、中科院、上海市科委共同资助[Supported by grants from the Ministry of Science and Technology, the Chinese Academy of Sciences and the Shanghai Municipal Commission of Sciences and Technology]

作者简介: 胡欣(1974-), 女, 助理研究员, 在职硕士, 研究方向: 水稻基因组学。E-mail: xhu@ncgr.ac.cn; Tel: 021-54971316

通讯作者。E-mail: bhhan@ncgr.ac.cn; Tel: 021-64825260

异性融合<sup>[1,2]</sup>。

SNARE 在膜转运的特异性形成中具有核心的地位,但 v-SNARE 与 t-SNARE 的结合是一种近程的作用。研究显示,还有其他许多蛋白质复合体参与了将不同性质的转运小泡牵引至其正确的受体细胞器的过程,他们被统称为小泡牵引复合体 (vesicle tethering complex),已经发现的有 exocyst、COG (conserved oligomeric Golgi, COG) 复合体、GARP (Golgi-associated retrograde protein, GARP) 复合体、TRAPP (transport protein particle, TRAPP) 复合体、C 类 Vps (vacuolar protein sorting, Vps) 复合体和 Dsl1p 复合体等<sup>[3]</sup>。

不同的小泡牵引复合体以不同的方式参与不同的膜转运过程。其中 TRAPP 最早发现于酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的内质网 - 高尔基体转运后期<sup>[4]</sup>。酵母的 TRAPP 包括两类复合体:约 300 kD、包含 7 种亚基的 TRAPP<sup>[6]</sup>和约 1 000 kD、包含 10 种亚基的 TRAPP<sup>[7]</sup>。虽然两者的分工和作用机理尚未完全明确,但已知 TRAPP 是高尔基体膜的外围蛋白质,虽不跨膜,却与膜的作用非常紧密<sup>[7]</sup>,它可能通过激活膜表面的一个 Rab-GTPase (Ypt1)<sup>[8]</sup>从而触发 SNARE 桥的形成,其间可能还有其他蛋白质因子如 Sec34p-Sec35p 和 Uso1p 等的参与<sup>[9]</sup>,而 TRAPP 的一个亚基 Bet3p 在其中可能起着核心的作用<sup>[4]</sup>。

随着人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 等真核生物基因组测序的基本完成,充分运用这些信息指导研究者高通量的、快速的寻找和鉴定分析其基因已成为一种普遍的认知。本研究正是通过这样的途径,应用 RT-PCR 结合测序的方法,鉴定了水稻基因组中的 10 个 *trs*-like 基因,进而对其转录模式、基因结构及同源关系进行了分析考证。我们发现,水稻中至少有 10 个具有广泛转录活性的 *trs*-like (TRAPP subunit, *trs*) 基因,分别对应于酵母 TRAPP 的 6 个亚基,其中对应于 Bet3p、Trs20p、Trs23p 和 Trs33p 的 4 对水稻基因是双拷贝的,对应于 Bet5p 和 Trs31p 的则是单拷贝的 (基于目前已完成的水稻基因组序列)。这 10 个基因同时存在于水稻的 2 个亚种——籼稻和粳稻中,且序列和结构上几乎完全相同。由于另外 4 个亚基 (Trs65p、Trs85p、Trs120p、Trs130p) 不具备物

种间的同源性或任何已知的保守结构域,因此无法用这样的方法找到其在水稻中的编码基因。进一步将水稻中的这组 *trs*-like 基因与其他真核生物中的同源基因进行基因结构、蛋白质序列及进化等层次上的比较分析后发现,这是一组高度保守的基因,尤其是 *bet 3*,其基因结构的保守性甚至跨越了动物与植物的界限。此外,酵母和拟南芥基因组中这组 *trs* 基因都是单拷贝的,现有证据也表明酵母的 TRAPP II 是由 10 种亚基等当量组成的 20 聚体<sup>[7]</sup>,而水稻中却至少有部分基因是双拷贝的,且 2 个拷贝在同种组织中的转录强度往往有很大的差异。对人的 *trs20* 的 2 个拷贝 *SEDL* 和 *MIP-2A* 的研究<sup>[10,11]</sup>已表明,它们不但具有不同转录谱,也行使着不同的生物学功能。因此水稻中这组基因的功能将是值得关注的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

水稻品种为粳稻日本晴 (*O. sativa* subsp. *japonica* cv. Nipponbare) 和籼稻广陆矮 4 号 (*O. sativa* subsp. *indica* cv. Guangluai4)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组序列注解与同源搜索

在本中心自主开发的基因组序列注解平台上对日本晴 4 号染色体上完全测序的 2 个相互重叠的 BAC 克隆 OSJNBb0116k07 (GenBank 登录号: AL731638) 和 OSJNBa0014k14 (GenBank 登录号: AL606604) 进行了基因预测 (使用了 fGeneSH、GeneMark、GeneScan 和 Glimmer 4 种基因预测软件) 和人工校正 (主要根据 blast-est、blast-p、CD-Search 等同源比较的结果)<sup>[12]</sup>,发现其重叠部分有一个假定基因 (putative gene) 与酵母的 *trs20* 高度同源。收集了酵母 TRAPP 的所有 10 个亚基的序列,在 NCBI 数据库中用 tblastn 寻找到在人、小鼠、拟南芥和水稻等真核生物基因组中可能的同源序列,将其筛选后进行进一步的分析注解。

#### 1.2.2 水稻不同时期组织的培养收集和总 RNA 的提取

在人工气候室中播种培养日本晴和广陆矮 4 号,陆续采集了广陆矮 4 号的幼苗、日本晴的根、幼

苗(20 d 左右,水培)以及孕穗期剑叶、灌浆期剑叶、受精的花等6种组织。同时在黑暗条件下培养并采集日本晴的黄化苗(20 d 左右)。使用 RNeasy Plant Mini Kit 分别提取上述7种组织的总 RNA,并以 RQ1 DNase 处理,鉴定后作为 RT-PCR 的模板。

### 1.2.3 RT-PCR 及测序

根据序列注解的结果,用引物设计软件 PrimerSelection (GCG package) 和 xprimer-on-

line (<http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html>) 设计了 PCR 引物(表 1),并由上海生工合成。所有引物序列在已知水稻基因组序列中都是独一无二的。对 4 对可能的双拷贝基因,则选择其序列上有差异的区段作为引物以保证 RT-PCR 的特异性。

采用 TaKaRa 公司的 RNA PCR Kit (AMV) ver. 2.1 进行 RT-PCR。采用较高的退火温度(55 °C)以保证扩增的特异性,循环数为 35。用 MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) 对产物进行纯化并以 Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 在 3730 型测序仪(ABI)上对其进行双向测序。

鉴定转录的组织特异性时,每个扩增反应的起始总 RNA 模板量大约 0.5 µg,但由于不同组织的样品制备获得率差异较大,这一定量不是很准确。同一组织的所有第一链模板的合成是在一个反应管中完成,分装后再用不同的引物合成第二链,因此同一组织不同基因相互间的转录差异更具有可比性。为避免其转录差异被 PCR 扩增所掩盖,实验的循环数被降至 25 个。

### 1.2.4 蛋白质序列与结构分析

使用多重序列同源比较软件 Clustal W (<http://www.biosino.org>) 对蛋白质序列进行同源比较,利用软件 TreeView 1.6.6 (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk>) 画出相应的进化树。利用蛋白质高级结构预测软件 Predict Protein 和 3D-PSSM (<http://us.expasy.org/tools>) 对有关序列的二级结构进行预测。

## 2 结果

表 1 水稻 trs-like 基因 RT-PCR 引物

Table 1 RT-PCR primers used for the trs-like genes in rice

基因 Gene	引物序列	
	正向 Forward(5' 3')	反向 Reverse(5' 3')
<i>Os3 bet3</i>	TCCGGGGACGCCCTCTTC	CATACCTACTTGATGCTGCCG
<i>Os7bet3</i>	GTCCGGGGACGCTCTCTTC	GGATCGTAAACGCTTTGTCAAA
<i>Os1bet5</i>	GAA GCTCA TGTTCGGCCTCC	CAAGGTGCTTATTGAAAA GCTCG
<i>Os2trs20</i>	GTCTCGTCTCCTCCGCTC	GGCGGTGTGGA GCTTACAG
<i>Os4trs20</i>	CGACA TCCCAA TCTATGAGGC	CATAAGCACTGGA GAAA GCCC
<i>Os6trs23</i>	ATGGCGTCA GCA GCAA TCTAC	CCAAA GGCA GTGCA GGAATC
<i>Os7trs23</i>	ATGGCGTTA GCA GCAA TCTAC	CACA TACAAA GACATGGT GCG
<i>Os1trs31</i>	GAGGA GGGTGGCAA GATG	CACAAA TCA TGTGGA GTCA GC
<i>Os7trs33</i>	GGGTGGTCA TGA GATGG	CTTAA TAA GCGCACAA GGCA G
<i>Os9trs33</i>	GAGGTTGCGGAGAGCTGTG	GGAGTTGCATGCAAA G TAAAAGG

### 2.1 水稻中至少存在 10 个具有转录活性的 trs-like 基因

对已知水稻基因组序列的分析注解发现,酵母 10 种 TRAPP 亚基中具有保守结构域的 6 个(*bet3*、*bet5*、*trs20*、*trs23*、*trs31* 和 *trs33*) 都能在水稻中找到同源的假定基因,其中 *bet3*、*trs20*、*trs23* 和 *trs33* 各有 2 个候选基因,且 2 个拷贝间序列非常相似。我们根据酵母中同源基因的名称辅以其在水稻基因组中的位置加以命名,如 *Os7bet3* 即表示该基因位于水稻 7 号染色体上,是 *bet3* 的同源基因。

以日本晴幼苗的总 RNA 为模板,分别对这 10 个假定基因进行 RT-PCR 验证(图 1, A),10 对引物均扩增出了特异性条带。RT-PCR 产物经纯化后进行双向测序发现,各段序列与相应的假定基因的编码序列相吻合,尤其是 4 对双拷贝基因,其 RT-PCR 产物的序列差异与相应基因组序列的差异一致。但是,由于 *Os1bet5* 的 5' CDS 的 GC 含量过高,不适合用作引物序列,因此,该基因第 1 个外显子的相当一部分序列未经证实,在后文的分析中保留该部分的预测结果。

综上所述,水稻中至少存在 10 个具有转录活性的 trs-like 基因,RT-PCR 产物测序结果与对应的基因组序列的比对证实了这组基因的结构和剪接位点。表 2 列出了这 10 个基因的基本特征,图 2 则显示了它们在水稻染色体上的位置。

### 2.2 水稻的 trs-like 基因具有广泛的转录活性

拟南芥中与这 6 个酵母 TRAPP 亚基同源的基因均为单拷贝,而在水稻中则既有单拷贝又有双拷

存在。这 4 组双拷贝基因是同步表达还是组织特异性表达呢? 为此, 我们选取了日本晴的绿苗、黄化苗、根、孕穗期的剑叶、灌浆期的剑叶、受精的花以及

广陆矮 4 号的绿苗共 7 种不同的组织的总 RNA 作为模板, 用 RT-PCR 的方法检测了所有 10 个基因的转录谱(图 1)。

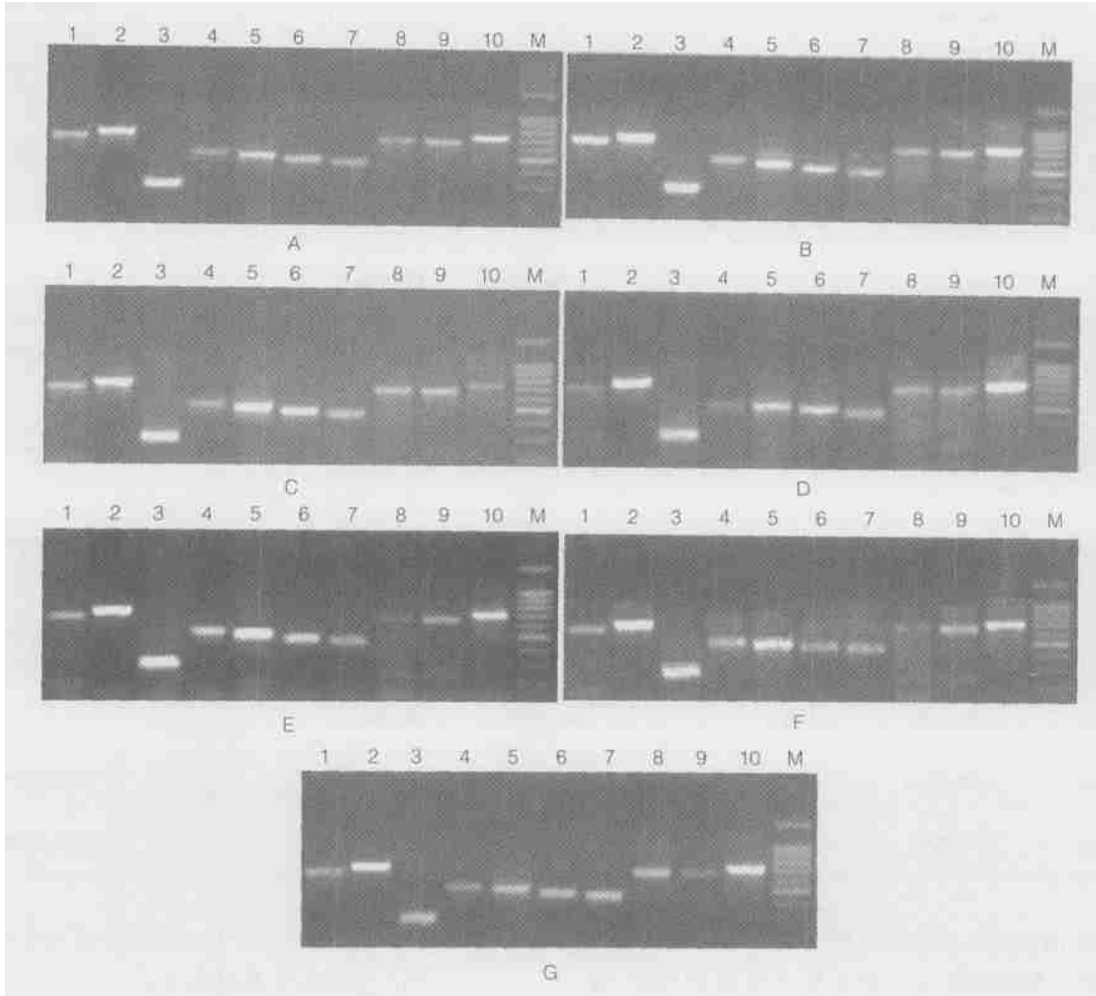


图 1 水稻 *trn*-like 基因在不同组织中的转录

A: 日本晴 20 d 绿苗; B: 日本晴 20 d 黄化苗; C: 日本晴 20 d 根; D: 日本晴受精的花; E: 日本晴孕穗期剑叶; F: 日本晴灌浆期剑叶; G: 广陆矮 4 号 20 d 绿苗。1~10: *Os3bet3*、*Os7bet3*、*Os1bet5*、*Os2trn20*、*Os4trn20*、*Os6trn23*、*Os7trn23*、*Os1trn31*、*Os7trn33*、*Os9trn33*; M: 100 bp DNA 梯度分子量标记。

Fig. 1 Transcription profile of rice *trn*-like genes in different tissues

A: 20 d green shoot of Nipponbare; B: 20 d yellow shoot of Nipponbare; C: 20 d root of Nipponbare; D: Fertilized flower of Nipponbare; E: Flag leaf of booting stage Nipponbare; F: Flag leaf of filling stage Nipponbare; G: 20 d 'green shoot of GLA4. 1~10: *Os3bet3*、*Os7bet3*、*Os1bet5*、*Os2trn20*、*Os4trn20*、*Os6trn23*、*Os7trn23*、*Os1trn31*、*Os7trn33*、*Os9trn33*; M: 100 bp DNA ladder marker;

结果表明: 1) 所有 10 个基因在 2 个水稻品种及不同时期的多个组织中均有表达; 2) 单拷贝的 *Os1bet5* 在所有 7 种组织中均有稳定的强表达; 而同样是单拷贝的 *Os1trn31* 虽然也有稳定表达, 但强度较 *Os1bet5* 明显减弱, 尤其在孕穗期及灌浆期的

剑叶中; 3) 一对 *bet3* 基因中, *Os7bet3* 的表达始终处于强势, *Os3bet3* 只有在黄化苗中表达水平才略有增强, 并且 *Os4trn20* 较 *Os2trn20*、*Os9trn33* 较 *Os7trn33* 也始终处于强势地位; 一对 *trn23* 的强弱不象另 3 对那么分明, 总体上而言, *Os6trn23* 可能

表 2 水稻 trs-like 基因的基本特征

Table 2 Some features of the trs-like genes in rice

基因 Genes	对应基因组序 列的 GenBank 登录号 GenBank Acc. No. of the genomic sequences	基因跨度 Gene span (bp)	外显子 数目 Exon No.	已证实的 5 / 3 非翻译区 Confirmed 5 / 3 UTR (bp)	编码蛋白质的 长度/分子量 Coding protein length (a. a.)/ MW (kD)	保守结构域 Conserved do- mains	与另一水稻拷贝 的同源性(编码 序列/蛋白质序 列水平) Homology with another copy in rice (CDS/ protein sequence level)
<i>Os3bet3</i>	AC084380	2 367	5	none/ 180	187/ 20.9	Pfam04051, COG5128	98 %/ 100 %
<i>Os7bet3</i>	AP003765	1 913	5	none/ 233	187/ 20.9	Pfam04051, COG5128	98 %/ 100 %
<i>Os1bet5</i>	AP002970.2	2 172	4	none/ none	179/ 19.8	Pfam04099, COG5122	
<i>Os2trs20</i>	AP005300	4 379	5	103 + 2/ 39	135/ 15.4	Pfam04628, Pfam04099, COG5603	84 %/ 94 %
<i>Os4trs20</i>	AL731638	1 476	5	none/ 166	135/ 15.3	Pfam04628, Pfam04099, COG5603	84 %/ 94 %
<i>Os6trs23</i>	AP004806	1 696	3	none/ 63	143/ 16.2	Pfam04099, COG5122, COG5603	98 %/ 98 %
<i>Os7trs23</i>	AP005752	1 689	3	none/ 39	143/ 16.2	Pfam04099, COG5122, COG5603	98 %/ 98 %
<i>Os1trs31</i>	AP002901	4 148	8	16/ 88	194/ 21.7	Pfam04051, COG5128	
<i>Os7trs33</i>	AP004346	4 560	4	none/ 176	175/ 19.5	Pfam04051, COG5128	91 %/ 95 %
<i>Os9trs33</i>	AP005729	3 957	3	none/ 22	174/ 19.6	Pfam04051, COG5128	91 %/ 95 %

略占优势;4) 强势表达的基因 *Os7bet3*、*Os1bet5*、*Os4trs20*、*Os9trs33* 无论是单拷贝还是双拷贝,在同一种组织中的转录强度也较为相近。

### 2.3 水稻与其他真核生物 trs-like 基因的同源比较

在对酵母 TRAPP 的研究中,曾将其各个亚基与人的同源基因及其相应的蛋白质在序列上加以比较并发现了一些规律<sup>[7]</sup>。而本研究将水稻的这组 trs-like 基因与包括酵母、人、拟南芥及其他一些真核生物的同源基因(至少有局部甚至全长 EST 支持)在基因结构、蛋白质序列及其二级结构等 3 个层面上加以进一步的比较和分析,以更多的发现其中的异同之处,为进一步的功能研究提供线索。

#### 2.3.1 真核生物中 6 组 Trs 同源蛋白质的保守性首先体现在其基因结构上

我们在水稻 4 号染色体基因注解工作中发现,一些高度保守的、高等植物中共有的基因以及一些多拷贝基因不仅在其编码的蛋白质的序列上有很高的同源性,其基因结构也有一定的特征:它们的外显子数目相同或相近(相近往往意味着有外显子融合或断裂),而且相应位置上的外显子大小也相同或相差 3n(n 通常都很小)。水稻与拟南芥中的这组 trs-like 基因就很好的吻合了这一规律(表 3)。

这种基因结构上的相似性规律在 *bet3* 中表现的尤为明显,它不仅仅存在于高等植物之间,甚至也存在于植物与动物以及低等的寄生虫之间(图 3),这也从一个侧面说明了 Bet3p 在 TRAPP 复合体中具有核心的地位。

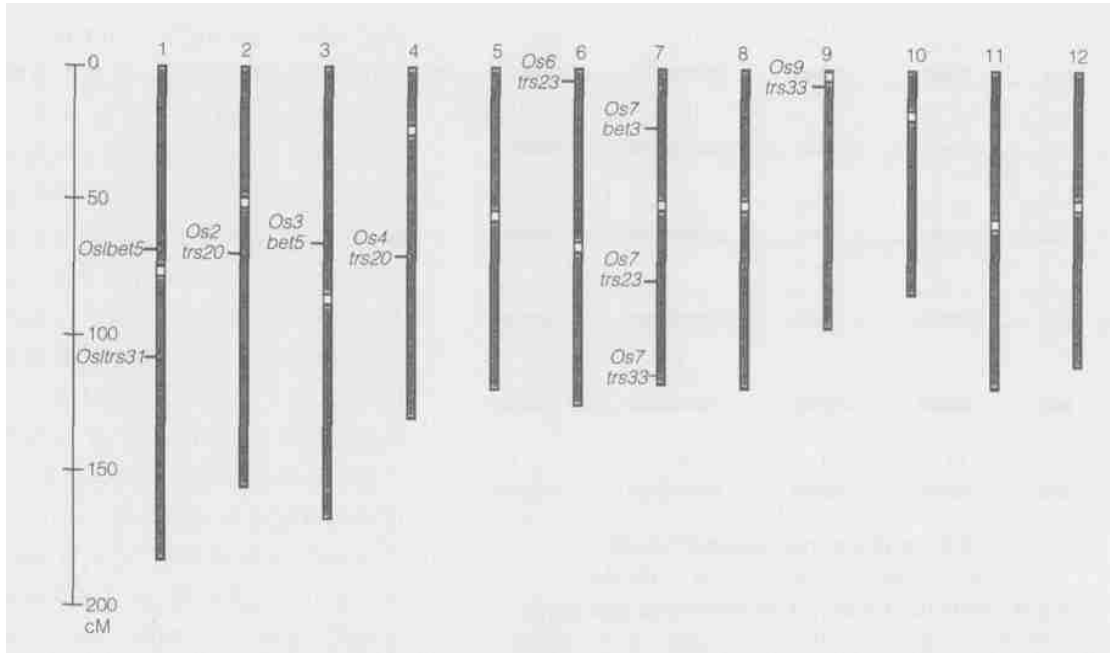


图 2 水稻 *trs*-like 基因的染色体定位

Fig. 2 Chromosome location of *trs*-like genes in rice

表 3 水稻与拟南芥的 *trs*-like 基因的结构比较

Table 3 Structural analysis of *trs*-like genes between rice and Arabidopsis

基因 Gene	外显子结构与长度 Structure & Length (bp) of exons	基因 Gene	外显子结构与长度 Structure & Length (bp) of exons
<i>Os3 bet3</i>	60-98 - 100 - 183 - 123	<i>Os2 trs20</i>	81 - 86 - 61 - 87 - 93
<i>Os7 bet3</i>	60 - 98 - 100 - 183 - 123	<i>Os4 trs20</i>	81 - 86 - 64 - 84 - 93
<i>At5 bet3</i>	57 - 98 - 100 - 183 - 123	<i>At1 trs20</i>	81 - 86 - 61 - 87 - 93
<i>Os6 trs23</i>	66 - 169 - 197	<i>Os7 trs33</i>	152 - 118 - 229 - 29
<i>Os7 trs23</i>	66 - 169 - 197	<i>Os9 trs33</i>	152 - 118 - 255
<i>At5 trs23</i>	60 - 169 - 197	<i>At3 trs33</i>	152 - 118 - 223 - 29
<i>Os1 bet5</i>	254 - 115 - 119 - 52	<i>Os1 trs31</i>	72 - 89 - 64 - 78 - 77 - 67 - 108 - 30
<i>At1 bet5</i>	224 - 115 - 119 - 52	<i>At5 trs31</i>	72 - 89 - 64 - 78 - 77 - 67 - 108 - 33

*Os*:水稻; *At*:拟南芥。

*Os*: *O. sativa*; *At*: *A. thaliana*.

2.3.2 所有 6 组同源蛋白质的保守性及差异

我们将收集整理到的 GenBank 中已有的真核生物 6 组 Trs 同源蛋白质序列加以比较后绘制成进化树(图 4)。由图 4 可见:1)对于任何一种蛋白质,同物种中的 2 个拷贝(如果有的话)的同源程度远远高于物种间,而同为植物的水稻与拟南芥、同为动物的人与小鼠的亲缘关系则近于它们相互之间或与线虫、酵母等其他真核生物的关系;2)对于本文所讨论的 6 组蛋白质而言,Trs20p 与 Trs23p 最为同源,它们共同拥有保守结构域 Pfam4099 和 CO G5603,而同样拥有 Pfam4099 的 Bet5p 与它们的相似程度则大于拥有 Pfam0451 和 CO G5128 的另外 3 组蛋白质 Bet3p、Trs31p、Trs33p。

对 6 组蛋白质序列分别加以更细致的分析后发现,Bet3p 是所有亚基中在蛋白质序列水平上最为保守的,其他几个亚基的保守程度则略逊一筹。水稻、拟南芥、人的 Trs20p、Trs23p、Trs31p 较之酵母明显为小,有较大的序列缺口。人的 Trs31p 相对于酵母所存在的一段富含丝氨酸(30%)的序列缺口<sup>[7]</sup>同样存在于水稻和拟南芥中。3 种高等生物的 Trs20p 则都存在 1 段 21 个残基的、富含天冬氨酰(28%)和甘氨酸(38%)的缺口。二级结构预测的结果表明,这 2 段缺口序列都是低复杂度序列,可能形成 1 段卷曲(coil),连接其 N-侧和 C-侧的 2 段结构;对 Trs31p 来说,很可能是 2 段螺旋结构(helix),对 Trs20p 则可能是 1 段螺旋和 1 段片层(sheet)结

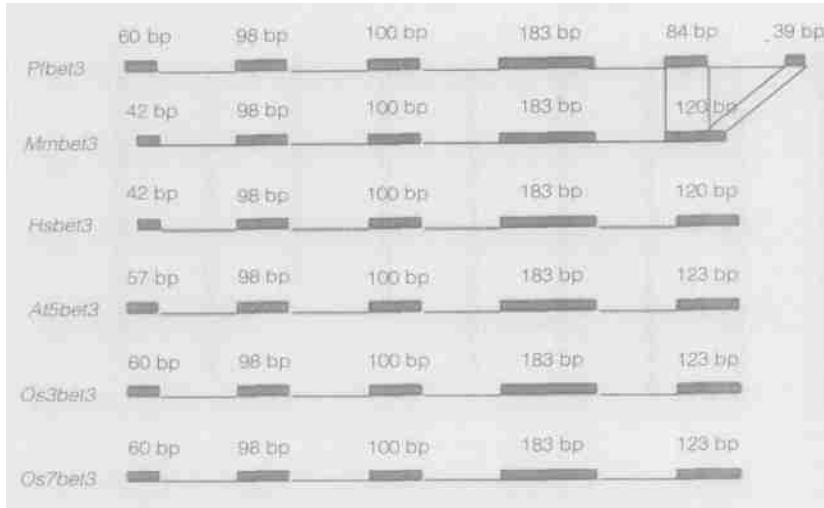


图3 真核生物 *bet3* 基因的结构比较

*Pf*: 疟原虫; *Mm*: 小鼠; *Hs*: 人; *At*: 拟南芥; *Os*: 水稻。

Fig. 3 Structural Analysis of eukaryotic *bet3* genes

*Pf*: *Plasmodium falciparum*; *Mm*: *M. musculus*; *Hs*: *H. sapiens*;

*At*: *A. thaliana*; *Os*: *O. sativa*.

构。这 2 段缺口并不影响 2 种蛋白质所包含的功能结构域的完整性,根据其高级结构预测的结果来看,也不会使其高级结构产生太大的改变。可见,这 2 个亚基仍然是相当保守的。

### 3 讨论

随着基因组研究的飞速发展,充分利用已有数据快速、简便的鉴定基因并对其进行进一步的结构与功能研究就非常重要了。本研究就是在综合各方面的数据并对相关基因组序列进行了深入细致的分析的基础上,用 RT-PCR 结合测序的方法,鉴定了水稻基因组中的 10 个 *trs*-like 基因,进而对其转录模式、基因结构及同源关系进行了分析考证。

本文根据 RT-PCR 结合测序的结果判断,水稻基因组中至少有 10 个具有转录活性的 *trs*-like 基因,它们的编码产物分别与酵母 TRAPP 复合体 10 个亚基中的 6 个有较高的同源性,其中 8 个是 4 对双拷贝基因,另 2 个则是单拷贝的,并且在水稻的 2 个亚种——籼稻和粳稻中都存在,其序列与结构也基本一致。从这 10 个基因在不同时期、不同组织中的表达谱来看,它们都具有广泛的转录活性,根据其强弱大致可以分为两组:1) *Os7bet3*、*Os1bet5*、*Os4trs20*、*Os6trs23* 和 *Os9trs33* 在多数组织中均有较强的转录活性;2) 而 *Os3bet3*、*Os2trs20*、

*Os7trs23*、*Os1trs31* 和 *Os7trs33* 则普遍较弱。这是否意味着 *Os1bet5* 和 *Os1trs31* 并非单拷贝基因,只是由于基因组序列尚不完整而未被发现?或是由于水稻 TRAPP 复合体的组成并不象酵母中那样由各亚基等当量构成呢?另一方面,为什么这组基因在酵母和拟南芥中都是以单拷贝形式存在,而在水稻中却出现基因复制的现象,且 2 个拷贝均有表达呢?一种推测是除了构成 TRAPP 复合体参与内质网-高尔基体定向转运之外,它们的功能可能更加复杂。在人中同样有 2 个 *trs20* 的同源基因,它们在编码序列上也几乎完全相同,但其转录谱却不尽相同,其中一个 (*MIP-2A*) 已被证实具有 MBP-1 的结合活性并由此解除后者对 *c-myc* 启动子的抑制,因而可以认为是一种细胞

周期调控因子。有鉴于此,对水稻中这组 *trs*-like 基因的功能展开进一步的研究将是非常必要的。

此外,水稻这组 *trs*-like 基因中的复制现象明显与人的 2 个 *trs20* 同源基因在机制上不同:人的 *SEDL* 由 4 个外显子组成,而 *MIP-2A* 则是单外显子,这是典型的由 RNA 介导的转座 (RNA-mediated transposition)<sup>[13]</sup> 引起的基因复制,而水稻的 4 对基因其外显子数目、长度基本一致,而内含子大小和基因跨度却有较大的差异,其进化机制尚有待进一步的研究。

所有这 10 个基因在基因结构和编码的蛋白质序列上与另一种基因组序列已知的高等植物拟南芥的同源基因均体现出高度的相似性。对其中的 *bet3* 而言,这种相似性更是跨越了动物与植物、高等与低等真核生物的界线,这是相当罕见的,也暗示着其翻译产物在整个蛋白质复合体中可能具有核心的地位,因此,对 2 个 *Bet3p* 的功能的研究将是对整组基因功能研究的很好的切入点。另一方面,高度保守的 *Bet3p* 也是一个相当理想的分子进化标记。

从对这组 *trs*-like 基因的鉴定结果看,在基因组平台上高通量、快速鉴定基因的方法是完全可行的,其成功率很大程度上取决于注解的准确性。要提高准确性,不仅需要开发更好的预测软件,更需要大量的数据,尤其是 EST 和全长 cDNA 数据的积累,这是一个相辅相成、循环渐进的过程。如果能够进一步的

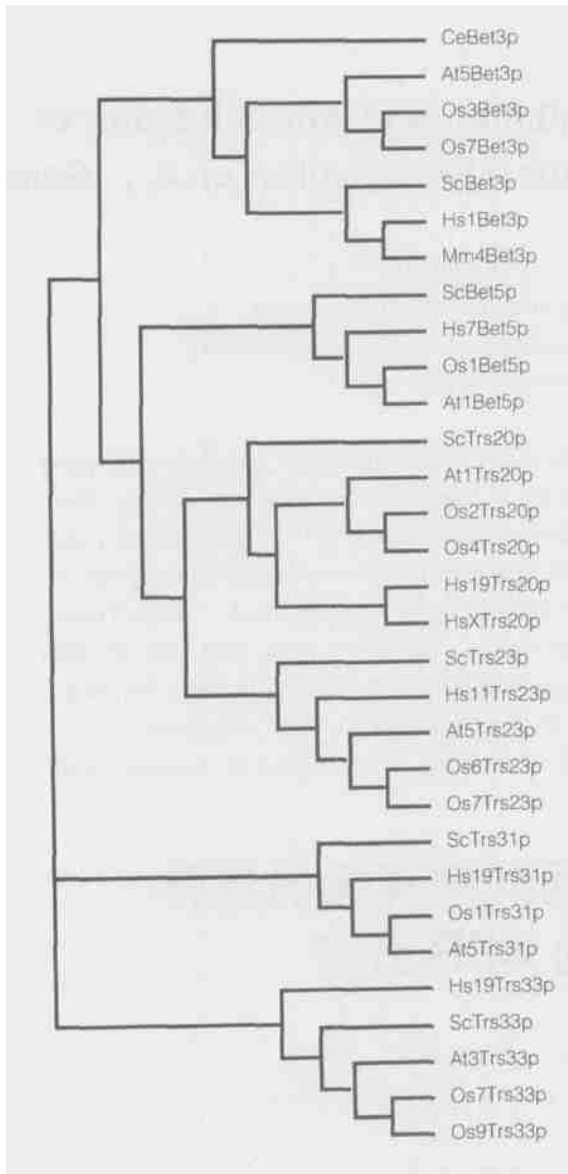


图4 真核生物6组 TRAPP 亚基的进化树

Ce:秀丽线虫;At:拟南芥;Os:水稻;Sc:酿酒酵母;Hs:人;Mm:小鼠。

Fig.4 Phylogenetic tree of eukaryotic TRAPP subunits

Ce: *C. elegans*; At: *A. thaliana*; Os: *O. sativa*; Sc: *S. cerevisiae*; Hs: *H. sapiens*; Mm: *M. musculus*.

结合芯片技术和突变体库的建立筛选,则有可能建立一个基因组水平上的基因结构-功能鉴定的高通量技术体系,这也正是我们未来努力的方向之一。

参考文献 (References) :

[ 1 ] Sollner T, Whiteheart S W, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman J E. SNAP receptors implicat-

ed in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 1993, 362(6418) :318 ~ 324.

[ 2 ] Chen Y A, Scheller R H. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2) : 98 ~ 106.

[ 3 ] Whyte J R, Munro S. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci*, 2002, 115 :2627 ~ 2637.

[ 4 ] Sacher M, Jiang Y, Barrowman J, Scarpa A, Burston J, Zhang L, Schieltz D, Yates Jr 3rd, Abeliovich H, Ferro-Novick S. TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J*, 1998, 17(9) :2494 ~ 2503.

[ 5 ] Barrowman J, Sacher M, Ferro-Novick S. TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking. *EMBO J*, 2000, 19(5) :862 ~ 869.

[ 6 ] Sacher M, Barrowman J, Wang W, Horecka J, Zhang Y, Pypaert M, Ferro-Novick S. TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to Golgi transport. *Mol Cell*, 2001, 7(2) : 433 ~ 442.

[ 7 ] Sacher M, Barrowman J, Schieltz D, Yates Jr 3rd, Ferro-Novick S. Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *Eur J Cell Biol*, 2000, 79(2) :71 ~ 80.

[ 8 ] Jones S, Newman C, Liu F, Segev N. The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(12) :4403 ~ 4411.

[ 9 ] Lowe M. Membrane transport: tethers and TRAPPs. *Curr Biol*, 2000, 10(11) : 407 ~ 409.

[ 10 ] Gedeon A K, Colley A, Jamieson R, Thompson E M, Rogers J, Sillence D, Tiller G E, Mulley J C, Gecz J. Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Nat Genet*, 1999, 22(4) :400 ~ 404.

[ 11 ] Ghosh A K, Majumder M, Steele R, White R A, Ray R B. A novel 16-kilodalton cellular protein physically interacts with and antagonizes the functional activity of *c-myc* promoter-binding protein 1. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2) :655 ~ 662.

[ 12 ] Feng Q, Zhang Y, Hao P, Wang S, Fu G, Huang Y, Li Y, Zhu J, Liu Y, Hu X, Jia P, Zhang Y, Zhao Q, Ying K, Yu S, Tang Y, Weng Q, Zhang L, Lu Y, Mu J, Lu Y, Zhang L S, Yu Z, Fan D, Liu X, Lu T, Li C, Wu Y, Sun T, Lei H, Li T, Hu H, Guan J, Wu M, Zhang R, Zhou B, Chen Z, Chen L, Jin Z, Wang R, Ying H, Cai Z, Ren S, Lv G, Gu W, Zhu G, Tu Y, Jia J, Zhang Y, Chen J, Kang H, Chen X, Shao C, Sun Y, Hu Q, Zhang X, Zhang W, Wang L, Ding C, Sheng H, Gu J, Chen S, Ni L, Zhu F, Chen W, Lan L, Lai Y, Chen Z, Gu M, Jiang J, Li J, Hong G, Xue Y, Han B. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature*, 2002, 420(6913) :316 ~ 320.

[ 13 ] Maeda N, Smithies O. The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annu Rev Genet*, 1986, 20:81 ~ 108.

(责任编辑:韩玉波)