4 Habben J E, Moro G L, Hunter B G, et al. Elongation factor-1α concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 8640~8644
5 Bonafonte M T, Preist J W, Garmon D, et al. Isolation of the gene coding for elongation factor-1α in *Cryptosporidium parvum*. Biochimet Biophys Acta, 1997, 1351: 256~260
6 Pokalsky A R, Hiatt W R, Ridge N, et al. Structure and expression of elongation factor-1α in tomato. Nucl Acids Res, 1989, 17: 4661~4673
7 Qing Y L, Baldauf S L, Reith M E, et al. Elongation factor-1α genes of the red alga *Porphyra purpurea* include a novel, developmentally specialized variant. Plant Molecular Biology, 1996, 31: 77~85
8 Axelos M, Bardet C, Liboz T, et al. The gene family encoding the *Arabidopsis* thaliana translation elongation factor EF-1α: Molecular cloning, characterization and expression. Mol Gen Genet, 1989, 219: 106~112
9 Durso N A, Cyr R J. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1α. The Plant Cell, 1994, 6: 893~905
10 Kurasawa Y, Hanyu K, Watanabe Y, et al. F-actin bundling activity of *Tetrahymena* elongation factor 1α is regulation by Ca^{2+}/calmodulin. J Biochem, 1996, 119: 791~798
11 Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrixchoice. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673~4680
12 Baum B R. PHYLIP: phylogeny inference package. Version 3.2. (Software review). Quarterly Review of Biology, 1989, 64: 539~541
13 Zhu J K, Damsz B, Andrzej K, et al. A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1α. The Plant Cell, 1994, 6: 393~404
14 Zhu Y X, Davies P J. The control of apical bud growth and senescence by auxin and gibberellin in genetic lines of peas. Plant Physiol, 1997, 113: 631~637
15 Zhu Y X, Zhang Y F, Luo J, et al. PPF-1, a post-floral-specific gene expressed in short-day grown G2 pea may be important for the maintenance of vigorous growth. Gene, 1997, 208: 1~6

(1998-12-23收稿, 1999-03-30收修改稿)

水稻金属硫蛋白核基因的克隆及其序列特征

余荔华 刘进元* 梅田正明④ 内宫博文④ 赵南明
(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;
④东京大学分子细胞生物学研究所, 东京 113-0032, 日本. * 联系人)

摘要 经RNA杂交分析发现*ricMT*基因在水稻茎部高效特异表达, 其表达是叶片中的100多倍, 暗示出该基因的5′上游可能贮藏着1个高效特异表达的启动子. 为了弄清*ricMT*基因的表达调控及启动子结构特征, 从水稻基因组文库中筛选出*ricMT*的核基因克隆, 并测出了4 084 bp序列, 其中包括2 970 bp的5′上游区, 约690 bp的转录区和420 bp的3′下游区. 经计算机分析发现, 编码区内含有2个长分别为64和110 bp的内含子; 5′上游区域内存在TATA box, CCAAT box, 以及在ATG上游区约300 bp处存在着典型的金属应答元件TGCGCGCG. 这些结果都有助于对植物金属硫蛋白基因的调控和金属应答机制的深入理解.

关键词 水稻 金属硫蛋白 核基因 调控序列

金属硫蛋白(metallothionein, 简称MT)是一类富含半胱氨酸的低分子量蛋白质, 广泛存在

于动物、植物和微生物中. 一般认为MT能够通过配位键结合金属离子, 从而在生物体的金属代谢和重金属解毒等方面发挥重要作用.

最近本研究组从水稻胚乳cDNA文库中获得了1个编码80个氨基酸的MT基因并命名为*ricMT*[1, 2], RNA杂交表明该基因在水稻茎部特异高效表达, 其表达量是叶片中的100多倍[2]. 为了弄清*ricMT*的表达调控机制, 本研究从水稻基因组文库中筛选出*ricMT*的核基因的克隆, 并对其全序列和5′上游区域进行了分析.

1 材料与方法

水稻基因组文库构建于λGEM-12的*Xho* iv位点, 由日本北海道大学加藤敦之惠赠. 文库筛选和DNA杂交所用探针均为*ricMT* cDNA. 采用DIG (digoxigenin) 探针标记和分子杂交法, 具体操作按Boehringer Mannheim说明书进行. 核苷酸序列测定在ABI公司的373S型DNA序列分析仪上进行. 噬菌体DNA的提取及实验中所用的分子克隆技术参见文献[3].

2 结果与讨论

2.1 阳性克隆物理图谱的构建及其序列测定

以DIG标记的*ricMT* cDNA为探针, 与基因组文库进行杂交, 得到18个阳性克隆. 提取阳性克隆的DNA, 选用*Eco*R iv进行酶切, 然后与探针杂交, 结果有10个克隆检测出阳性条带, 长度从700 bp到9 kb不等.

为便于进一步的分析, 将杂交片段分离出来, 克隆到pBluescript ㊐(SK⁻)质粒的*Eco*R iv位点. 选取包含4 kb长的4号克隆, 提取质粒后进行单酶切和双酶切分析, 得出了该片段的限制图谱(图1(a)). 再通过双酶切后的DNA杂交, 确认基因的转录部分在图1(a)所示的右侧约2.5 kb (粗线所示) 区域内.

将该4 kb阳性片段命名为*ricMTg*. 根据cDNA在*ricMTg*中的位置, 设计合适的引物进行测序. 如图1(b)所示, 首先利用克隆位点两侧的载体序列T3和T7, 以及*ricMT* cDNA的内部序列a和b(表1)为引物测序, 然后根据测出的序列依次设计新引物c, d, e, f, g和h(表1)依次步进, 逐步缩小未知区域, 最后获得*ricMTg*的全长核苷酸序列.

表1 用于测序的合成引物

编号	长度/nt	序列	位置/bp
a	24	GAAGAAGCTCTCATCATCATCACC*	3 038~ 3 061
b	26	AACCCACGACCACGACCACCTTCCTT	3 211~ 3 236
c	25	CAGGGGACGTCTCAAAGCACAAAGT	578~ 602
d	22	TGAGATAAGACGCATGGTGGTC*	2 658~ 2 679
e	23	CCATACAAGTAAGCAGCAGCTAG	2 991~ 3 013
f	24	GGAGGATCAGAGATGGGGGCGGAG*	3 383~ 3 406
g	24	CATATTCAGGTACTATTGCGGGTG	1 120~ 1 143
h	22	GGGGGAACAAGAATTGACACTC*	2 352~ 2 373

* 表示用于测序的是其互补序列

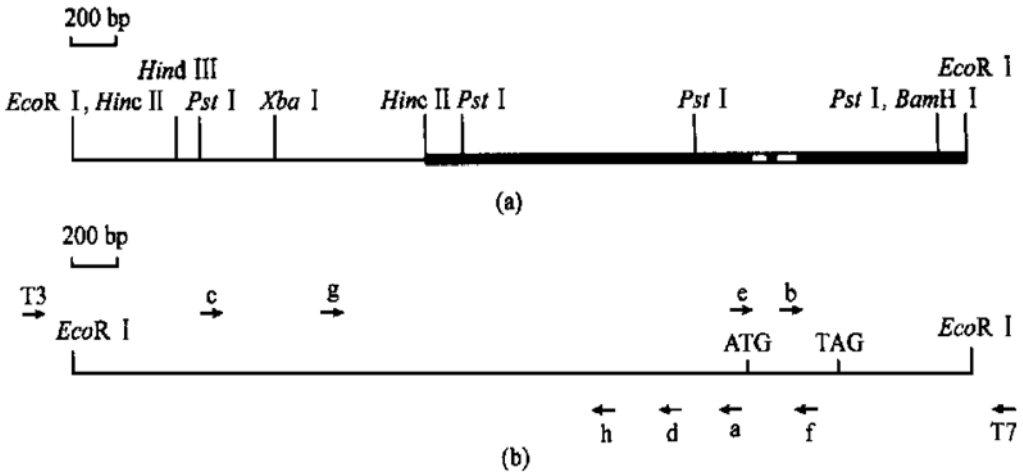


图 1 4 kb 阳性片段的限制图谱(a)与测序策略(b)

(a)粗线区表示含有 *ricMT* 编码序列的区段在 4 kb 阳性片段中的位置,空框表示内含子所在位置;

(b)箭头表示测序所用引物的位置和方向

2.2 *ricMTg* 序列分析

ricMTg 序列全长 4 084 bp,由约 2 970 bp 的 5′ 上游区,约 690 bp 的转录区和 420 bp 的 3′ 下游区组成(其中的编码区及部分调控序列已登录在 EMBL/GenBank/DDBJ 核苷酸序列库中,accession No. AB002820). 可能的 SD 序列 AAGAAGAAG 位于 3 036 bp 处,翻译起始密码子 ATG 位于 3 062 bp 处,终止密码子 TAG 位于 3 478 bp 处. *ricMT* 基因有 3 个外显子和 2 个内含子,外显子与内含子的连接处符合 GT/AG 规则. 第 1 个内含子长 64 bp,始于 3 127 bp 处;第 2 个内含子长 110 bp,始于 3 257 bp 处. 2 个内含子都含有 ATTACATG 和 GATCGAT 序列. 与之相比,来自棉花的 *MT1-A* 有 2 个内含子(1 042 和 130 bp)[4],来自豌豆的 *PsMTA* 只有 1 个内含子(634 bp)[5],来自水稻的 *rgMT* 也只有 1 个内含子(141 bp)[6],来自番茄的 *LeMTB* 也是 1 个内含子(1 097 bp)[7]. 尽管如此它们与 *ricMT* 的内含子无明显的同源性. 另外在 3 645 bp 处即终止密码子下游 167 bp 处,存在着转录终止信号 AAATAAAA.

计算机同源分析结果表明,5′ 上游区域的 TATA box (TATAAA) 位于 2 935 bp 处,CCAAT box (CCAAT) 位于 2 754 bp 处. 另一方面,在 2 739 bp 处(ATG 上游约 300 bp)存在着与动物典型的金属应答元件(metal-responsive elements,简称 MREs)的高度同源的序列 TGCGCGCG. 已有的研究显示,在哺乳动物 *MT* 基因的 5′ 上游区域存在着的 MRE 序列为 TGCRCBCG,其中 R 代表嘌呤,B 可以是除了腺嘌呤以外的任意碱基[8, 9]. 在金属离子例如锌离子的诱导下,MRE 活性增加,从而促进 *MT* 基因的表达. 该 MRE 的活性除了本身结构相关外,还与其在启动子中的位置有关[10]. 关于植物中 MRE 序列的报道迄今仅有 2 篇,1 个是豌豆的 *PsMTA*,其 MRE 类似序列由于其中 1 个关键碱基不符合已知 MRE 序列的排列特征,可能不具有金属应答功能[5];另 1 个是番茄的 *LeMTB*[7],功能也尚未得到解析. *ricMT* 的启动子区域内存在着 MRE 同源序列,暗示着金属参与转录调节的可能性,对其做进一步的研究必将有助于我们深入理解植物金属硫蛋白的金属应答机制.

在更上游区域,有 1 对 10 bp(TAAATTAAAT) 的直接重复序列,3 对分别为 11 bp (CCATATATATA, TATATATATGG), 7 bp (AACTAAA, TTTAGTT) 和 6 bp (ATGGAG, CTCCAT) 的反向重复序列,以及 1 个 16 bp (GATCGATCGAT CGATC) 的回文结构. 这些结构在该基因的

存在意义还有待阐明. 总而言之, 由于该基因在水稻茎部特异高效表达, 其编码序列的5′上游很可能贮藏着1个很强的启动子. 目前正在对其启动子的结构和功能进行深入研究.

致谢 本工作部分为国家"八六三"计划资助项目.

参 考 文 献

1 Liu J Y, Hara C, Umeda M, et al. Analysis of randomly isolated cDNAs from developing endosperms of rice (*Oryza sativa* L.): evalur-ation of expressed sequence tags, and expression levels of mRNAs. Plant Mol Biol, 1995, 29: 685~ 689
2 Yu L H, Umeda M, Liu J Y, et al. A novel *MT* gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. Gene, 1998, 206: 29~ 35
3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laborar-tory Press, 1989
4 Hudspeth R L, Hobbs S L, Anderson D M, et al. Characterization and expression of metallothioneir-like genes in cotton. Plant Mol Bi-ol, 1996, 31: 701~ 705
5 Evans K M, Gatehouse L N, Gatehouse J A, et al. A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homolog to metallothionein genes. FEBS Lett, 1990, 262: 29~ 32
6 Hsieh H M, Liu W K, Huang P C. A novel stress-inducible metallothioneir-like gene from rice. Plant Mol Biol, 1995, 28: 381~ 389
7 Whitelaw C A, Le Huquet J A, Thurman D A, et al. The isolation and characterization of type II metallothioneir-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Mol Biol, 1995, 29: 685~ 689
8 Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, et al. Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones in-duce human metallothioneir-ⅡA gene. Nature, 1984, 308: 513~ 519
9 Seguin C, Hamer D H. Regulation *in vitro* of metallothionein gene binding factors. Science, 1987, 235: 1383~ 1387
10 Samson S L, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998, 59: 257~ 288

(1998-11-25收稿, 1999-02-24收修改稿)

杜仲属果实化石在中国的首次发现

耿宝印 Steven R. Manchester④ 路安民
(中国科学院植物研究所系统与进化植物学研究中心, 北京 100093; ④Florida Museum of Natural History, Florida 32611)

摘要 采于辽宁省抚顺始新世地层中的杜仲属 *Eucommia* 果实化石, 是迄今为止在中国发现的可靠无疑的第一例该属植物的果实化石. 尽管杜仲现仅残存于中国中部地区, 但在第三纪该属植物在北半球有着相当广泛的分布. 抚顺化石标本与北美西部始新世 *Eucommia montana* Brown 果实非常相似, 根据它们的体积很容易和现生种 *E. ulmoides* 以及日本始新世种 *E. kobayshii* 加以区分.

关键词 **杜仲属 果化石 始新世 辽宁抚顺**

杜仲属 *Eucommia* 植物现今仅分布在中国, 是中国特有的植物. 但在地质时期的第三纪(距今65~ 1.6 Ma), 它曾广泛分布在北半球, 如: 墨西哥[1]、美国东、西部地区[2]以及欧洲许多地区[3,4]. 在亚洲, 杜仲属的果化石以前也曾发现于日本北海道的始新世[5], 哈萨克斯坦的早