

水稻 *Os01g61900* 基因的生物信息学解析及表达分析^{*}

李昀潼, 吴源源, 李翠萍, 冯小琴, 李晓薇, 李 明, 南文斌, 梁永书, 张汉马, 秦小健
(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市植物环境适应生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:水稻(*Oryza sativa*)*Os01g61900* 基因编码一个含 CCT 结构域的蛋白,而编码该类蛋白的基因家族大多参与了水稻的开花调控从而影响水稻的抽穗期和最终产量形成。为此,对*Os01g61900* 基因进行了生物信息学、亚细胞定位和组织表达分析,构建该基因的原核表达载体并进行了原核诱导表达,对它的表达产物进行了纯化。结果显示:1) *Os01g61900* 基因编码一个细胞核定位的 CCT 转录因子,后者的核心区具有 2 个明显的 α -螺旋结构;该基因在葡萄(*Vitis vinifera*)中存在 2 个同源基因,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)中也存在同源基因;该基因在水稻、玉米、二穗短柄草和高粱中处在同一个进化分支上。2) *Os01g61900* 基因在水稻的根和穗中表达量相对较高。3) 通过构建*Os01g61900* 基因的亚细胞定位载体,经原生质体转化与烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞转染发现该基因编码一个定位到细胞核的蛋白质。4) 成功构建了*Os01g61900* 基因的原核表达载体并对该基因进行了原核诱导表达与纯化,最终在体外获得了原核表达的重组蛋白。上述研究结果为今后对*Os01g61900* 基因功能的解析及该基因参与水稻抽穗期调控的分子机制的研究奠定了基础。

关键词:水稻;抽穗期;亚细胞定位;原核表达;蛋白纯化

中图分类号:Q94;S511

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2025)01-0117-08

水稻(*Oryza sativa*)是中国最主要的口粮品种,全国 60% 以上的人口以稻米为主食。水稻的稳产增产对于维护国家粮食安全、推动经济发展、增进民生福祉等都具有重大意义。抽穗期是影响水稻产量的关键时期之一,对抽穗期水稻相关基因进行挖掘以及对调控水稻抽穗的分子机理进行解析,是保证水稻稳产增产的重要课题。

当前已有大量的研究表明大多数含 CCT(CO、CO-LIKE 和 TOC1)结构域的蛋白均参与了水稻抽穗期的调控,且大部分克隆的水稻抽穗期调控相关基因都是 CCT 家族蛋白^[1]。CCT 结构域在植物中涉及信号途径众多,最初是在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中被发现和报道,由 CONSTANS(CO)、CO-LIKE 和 TIMING OF CAB1(TOC1)这 3 个蛋白 C 末端的 43 个氨基酸保守区段组成^[2-4]。有研究表明 CCT 结构域与它的核定位功能可能有关;同时也有研究表明该结构域的突变并不完全导致自身核定位功能的丧失但仍然引起了作物在抽穗期的变化,并推测该结构域可能还参与了其他的通路调节^[4]。根据 CCT 家族基因编码蛋白所含有的功能结构域,可以将它们分为 CMF、COL 和 PRR 这 3 个亚家族,其中:CMF 亚家族仅含有 1 个 CCT 结构域,COL 亚家族同时含有 B-box 锌指结构和 CCT 结构,PRR 亚家族含有 PRR 结构域和 1 个 CCT 结构域^[5]。在拟南芥中,该家族基因大多都参与了光信号通路^[6-7]、生物钟调节^[3,8-9]以及植物开花调控^[2]。拟南芥 CO 基因编码 1 个核蛋白,后者包含了 B-box 锌指结构域和 1 个 CCT 结构域^[2];过量表达该基因的拟南芥在长日和短日条件下都比野生型拟南芥提前开花,表明该基因参与了拟南芥的开花调控过程^[10]。PRR1(TOC1)是拟南芥中第 1 个被克隆 CCT 家族成员,它在拟南芥中通过生物钟功能来调控光周期开花途径^[3]。除 PRR1 外,该家族其他 4 个成员的功能还未被报道^[11]。*Hd3a* 基因是水稻中第 1 个被克隆的与水稻抽穗相关的基因,它编码一个由 178 个氨基酸残基组成的蛋白质,并让转基因水稻植株出现提早抽穗的现象^[12]。水稻 *RFT1* 基因与 *Hd3a* 同源且高度紧密,分别编码长日和短日条件下特异的成花素,并通过不同的途径调控水稻的抽穗期^[13-17]。水稻 *Hd1* 基因是拟南芥 CO 基

^{*} 收稿日期:2024-09-10 修回日期:2024-11-26 网络出版时间:2025-03-14T12:35

资助项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31800238);重庆市自然科学基金创新发展联合基金项目(No. CSTB2023NSCQ-LZX0024);重庆市教育委员会科学技术计划研究项目青年项目(No. KJQN201900509, No. KJQN202100536)

第一作者简介:李昀潼,女,研究方向为水稻功能基因组,E-mail:lh15213222686@126.com;通信作者简介:秦小健,男,副教授,博士,E-mail:qinxiaojian@cqnu.edu.cn

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20250313.1606.010

因的同源基因,它们所编码蛋白的 N 端都同时含有 1 个锌指结构域,且 C 端都存在保守的 CCT 结构,*Hd1* 基因在短日条件下促进水稻抽穗,在长日条件下抑制水稻抽穗^[18-19]。最新研究还发现 *Hd1* 基因第二个外显子上的一个单碱基突变表现出对光周期不敏感,表明该基因存在新的季节适应性等位变异,为后续遗传育种提供了新的基因资源^[20]。有研究表明,水稻 CCT 家族的转录激活基因 *Ghd2* 可通过增强 *OsCO3* 基因的表达来延迟水稻抽穗^[21]。水稻 *Ghd7* 基因同样是编码含有 CCT 结构域蛋白并控制水稻抽穗和株高的关键基因,在长日条件下被诱导后高表达,通过抑制下游的 *Ehd1* 和 *Hd3a* 基因表达来延迟水稻的抽穗^[22-25]。此外,水稻 *Ghd7* 基因上游还受 *OsCOL5* 基因的调控从而影响水稻抽穗和最终产量^[26]。水稻 *Ghd7.1/OsPRR37/DTH7* 基因属于 PRR 基因家族的成员,是典型的植物生物钟调控通路的重要组成部分,推测它可能是通过影响水稻的生物钟节律来调控抽穗^[27-29]。水稻抽穗期调控目前主要存在 2 条基本的调控路径:一条是以 *Hd1* 基因作为核心基因的 *Hd1-Hd3a* 的调控通路,另外一条则是以 *Ehd1* 基因为核心的 *Ghd7/Ghd8-Ehd1-Hd3a/RFT1* 调控路径^[19,30-31]。

基于上述背景,本研究以水稻中编码一个含有 CCT 结构域蛋白的基因 *Os01g61900* 为研究对象,通过生物信息学、亚细胞定位、蛋白原核表达纯化等方法对它进行了初步分析与研究,旨在为今后对该基因功能的进一步解析以及深入了解它参与水稻抽穗期调控的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

通过登录水稻基因组信息数据库 Rice Genome Annotation Project Database(<http://rice.uga.edu/>)获得了 *Os01g61900* 基因的基本信息;利用该基因编码的蛋白序列通过登录 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源比对获得了 8 个同源基因,并利用 MEGA5 软件(<https://www.megax.org/>)对同源基因进行进化树构建;通过蛋白结构数据库 Alpha Fold Protein Structure Database(<https://www.alphafold.ebi.ac.uk/>)预测了该基因编码的蛋白结构;此外,通过 PROSITE 工具(<https://prosite.expasy.org/>)对该基因在细胞内的定位进行了预测和分析。

1.2 亚细胞定位分析

提取水稻品种“中花 11”的 RNA 进行反转录,经 PCR 扩增获得了 *Os01g61900* 基因的全长编码序列,然后通过酶切连接将目标基因构建到本研究课题组前期改造好的载体 P06-35S-GFP 中,测序保存质粒;利用水培法培养“中花 11”的幼苗进行原生质体制备,同时进行转化后培养,用奥林巴斯 FV1000 型共聚焦显微镜进行观察、拍照和记录。另外将构建好的载体转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 菌株,经注射、培养,共聚焦观察,然后记录实验结果并分析。

1.3 荧光定量 PCR 分析

为了研究 *Os01g61900* 基因在不同组织中的表达差异,对处于抽穗期的“中花 11”植株根、茎、叶及穗分别进行取样,用 Trizol 法分离 3 μ g 总 RNA 进行反转录,采用 TaKaRa SYBR[®] Pre-mix Ex-Tag[™] II 试剂盒和罗氏 LightCycler[®] 480 型实时荧光定量 PCR 系统获得荧光定量 PCR 数据,并分析了该基因在不同组织中的表达变化。

1.4 重组蛋白的原核表达及纯化

将获得的 *Os01g61900* 基因全长编码序列经酶切连接构建到原核表达载体 pGEX6P-1 上,并转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)菌株中,进行异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的诱导条件优化,然后通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定重组蛋白的表达情况。IPTG 诱导表达条件确定后,对转化菌株进行放大培养,然后经超声破碎获得含重组蛋白的上清液,再采用谷胱甘肽-琼脂糖凝胶进行柱纯化并采用还原型谷胱甘肽进行梯度洗脱,将纯化后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定,最后透析备用。

2 结果与分析

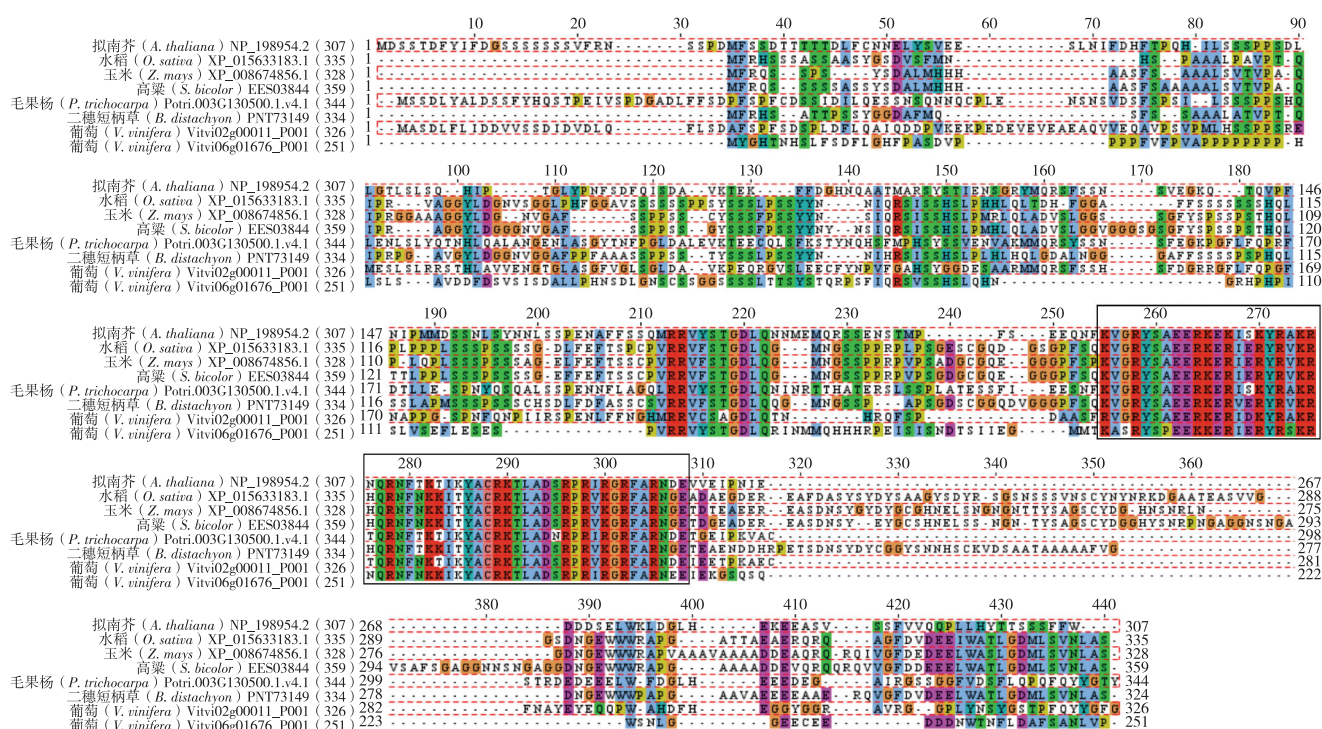
2.1 生物信息学及组织表达分析

登录 Rice Genome Annotation Project Database 进行查询,以水稻粳稻品种“日本晴”为参考,发现 *Os01g61900* 基因的编码序列长度为 1 008 bp,所编码的蛋白含 335 个氨基酸残基,且该蛋白属于 CCT 结构域家

族蛋白。同源比对分析发现 *Os01g61900* 基因在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、玉米 (*Zea mays*)、高粱 (*Sorghum bicolor*) 等 7 种植物中共有 8 个同源基因(表 1)。同时,序列比对分析发现这些同源基因在序列上相对保守,特别是在 CCT 结构域中有关氨基酸序列高度保守(图 1 中方框部分)。此外,利用同源基因进行进化树构建,结果表明 *Os01g61900* 基因在水稻、玉米、高粱、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 中处在同一个进化分枝上,可能与它在禾本科(Poaceae)中保守的生物学功能相关(图 2)。

表 1 不同物种中的同源基因
Tab. 1 Homologous genes in different species

序号	物种	同源基因	功能注释
1	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>AT5G41380</i>	CCT 结构域蛋白
2	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	<i>Os01g61900</i>	CCT 结构域蛋白
3	玉米(<i>Zea mays</i>)	<i>GRMZM2G062218</i>	CCT 结构域蛋白
4	高粱(<i>Sorghum bicolor</i>)	<i>Sb03g039060</i>	CCT 结构域蛋白
5	葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	<i>GSVIVG00019393001</i> 、 <i>GSVIVG00025065001</i>	CCT 结构域蛋白
6	二穗短柄草(<i>Brachypodium distachyon</i>)	<i>Bradi2g54260</i>	CCT 结构域蛋白
7	毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)	<i>POPTR_0003s13050</i>	未知蛋白



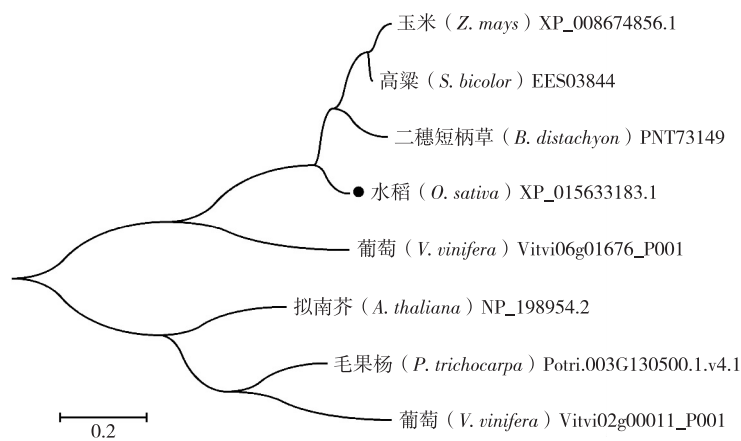
注:物种名后的编号为有关同源基因的 Genbank 登录号,括号内的数值为该基因所编码蛋白的氨基酸序列长度。

图 1 不同物种中的同源基因序列比对分析

Fig. 1 Sequence alignment of homologous genes in different species

通过查询 Alpha Fold Protein Structure Database, 获得了 *Os01g61900* 基因所编码蛋白可能的结构信息, 其中显示该蛋白核心区具有 2 个明显的 α -螺旋结构(图 3), 这可能与 DNA 的结合活性相关。此外, 通过荧光定量 PCR 分析发现该基因在根、茎、叶及穗中均有不同程度的表达, 且在根和穗中的表达量相对较高(图 4); 但是该

基因在营养生长期表达水平较高,而转换到生殖生长后表达量迅速降低,这可能与该基因参与水稻抽穗调控有关。为初步了解该基因是否为核定位的转录调控蛋白,通过 PROSITE 工具对该基因的细胞内的定位进行了预测,结果发现该基因可能编码了一个细胞核定位的蛋白质(图 5)。



注:物种名后的编号为有关同源基因的 Genbank 登录号。

图 2 不同物种中同源基因的进化分析

Fig. 2 Evolutionary analysis of homologous genes in different species

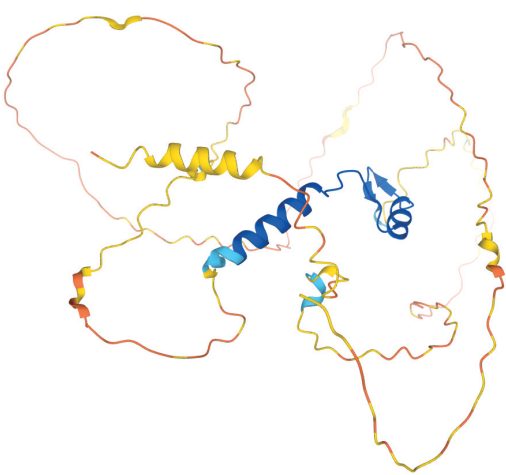


图 3 蛋白质结构预测

Fig. 3 Protein structure prediction

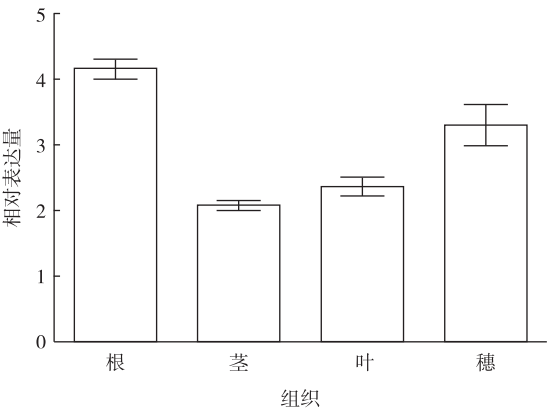


图 4 *Os01g61900* 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *Os01g61900* in different tissues

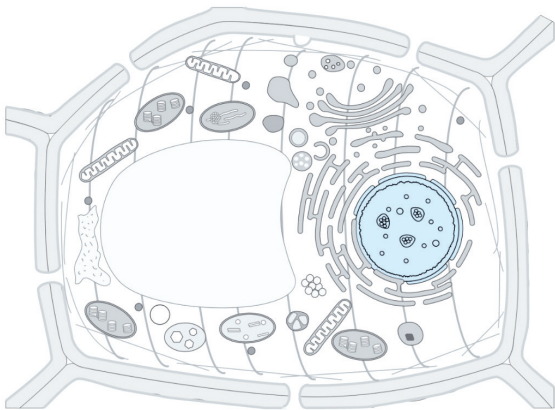


图 5 亚细胞定位预测

Fig. 5 Sub-cellular localization prediction

2.2 亚细胞定位分析

为了进一步验证 *Os01g61900* 基因是否编码一个核定位的蛋白质,通过构建该基因融合报告基因 *GFP* 的亚细胞定位载体,然后分别进行原生质体转化与注射烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞利用共聚焦显微镜进行了观察和分析。结果显示:在水稻的原生质体中观察到了 *Os01g61900* 基因主要在细胞核中表达,与细胞核的标记基因能够完全重合,表明该基因编码了一个核定位的蛋白质(图 6a)。另外,通过利用农杆菌注射烟草后进行观察,发现 *Os01g61900* 基因同样在细胞核内表达(图 6b),与在水稻原生质体中的结果一致,进一步说明了该基因编码了一个定位到细胞核的 CCT 家族结构域蛋白,从而为该基因后续功能的解析奠定了基础。

2.3 原核表达及蛋白纯化

植物 CCT 家族结构域蛋白作为典型的转录因子家族,一般通过调控下游的基因表达来影响植物的开花调控,具有明显的转录调控活性。为了获得 *Os01g61900* 基因的重组蛋白用于后续功能的深入研究,本研究构建了该基因融合 GST 标签的原核表达载体,经过诱导条件和纯化条件的摸索,最终成功地在大肠杆菌中获得了该基因的重组蛋白(图 7a),同时经透析后可用于后续功能的进一步研究(图 7b),这为进一步研究该基因的功能奠定了基础,也为解析该基因参与水稻抽穗调控分子机制的研究提供了可能。

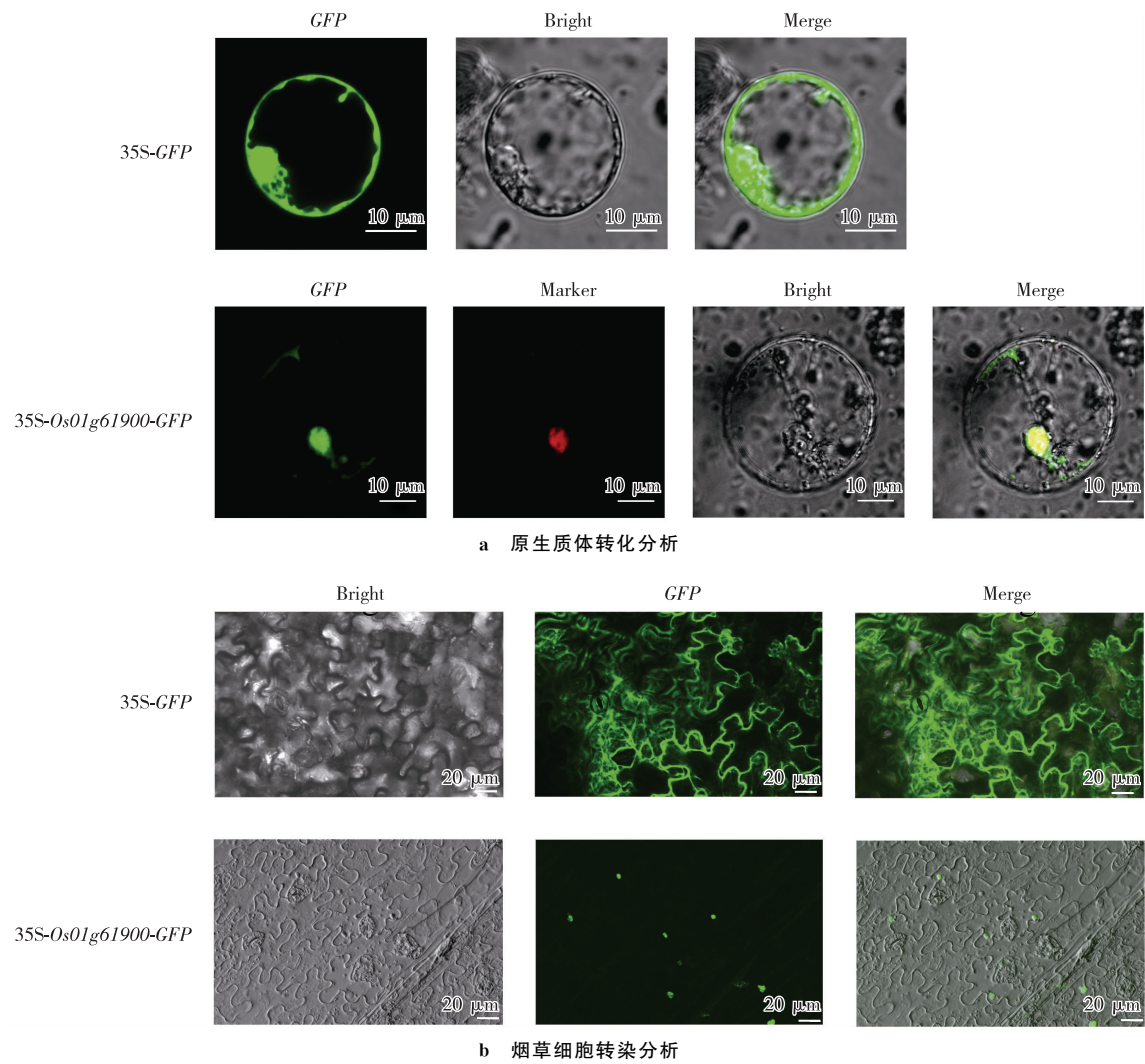
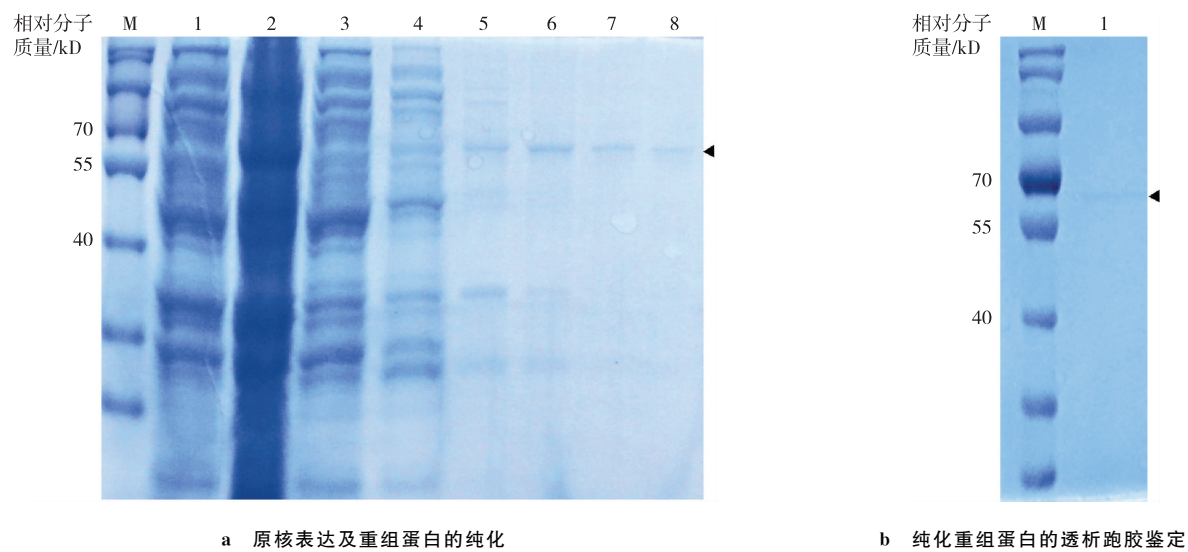


图 6 *Os0161900* 基因的亚细胞定位分析

Fig. 6 Protein sub-cellular localization analysis of *Os0161900*



注：M 为蛋白相对分子质量标准；图 a 中泳道 1~3 分别为未诱导组、诱导表达后沉淀和诱导表达后上清液，泳道 4~8 为蛋白梯度洗脱液；图 b 中泳道 1 为已纯化蛋白。

图 7 *Os0161900* 基因的原核表达及纯化

Fig. 7 Protein expression and purification of *Os0161900*

3 讨论

水稻是全球主要粮食作物之一。随着全球经济发展和全球人口规模的不断增大,人们对水稻等粮食的需求也在不断增加;粮食安全直接影响到社会的稳定与发展^[30]。水稻抽穗期的长短关系到水稻种植的季节性和产量的形成,开展水稻抽穗期的研究并选育适合不同地区种植的水稻新品种尤为重要。已有大量的研究表明植物的 CCT 家族基因大都参与了开花调控的过程,对植物最终产量的形成有着十分重要的影响^[22-24]。因此,分析和挖掘植物中 CCT 家族基因、研究该家族基因功能对人们认知植物的开花调控和作物的抽穗期育种具有重要意义。目前,在水稻中已定位了 41 个 CCT 家族基因,这些基因分布于水稻的 12 条染色体上,其中已克隆的 CCT 基因家族成员有 *Ghd7*、*Hd1*、*OsCO3*、*OsCOL4*、*DTH2*、*OsCCT01*、*Ghd8* 等^[19,30]。*CO* 基因编码产物是一个含有 B-box 锌指结构域和 CCT 结构域的核蛋白,是 COL 亚家族的一个重要成员,在拟南芥叶中呈节律性表达,且在长、短日照条件下对植物开花都具有促进作用^[10,32]。另外有研究发现,*COL3* 基因过表达的植株开花时间提前,同时植株的胚轴变长、不定根减少,形态也发生了改变^[33]。PRR 亚家族一共有 5 个成员,其中第 1 个被克隆的该家族成员 PRR1(TOC1)是通过生物钟功能来调控植物光周期的开花途径^[3,11,34]。*Ghd7* 基因的编码产物是 CMF 亚家族的成员,具有延迟水稻抽穗的功能,它对水稻的株高和产量都有一定影响^[35]。此外,有研究报道通过 CRISPR/Cas9 技术对 CCT 基因家族进行基因敲除,只有 4 个基因的敲除突变体的抽穗期发生了改变,这表明 CCT 家族基因在调控这一性状方面可能存在功能冗余^[36]。本研究新鉴定的 *Os01g61900* 基因编码一个 CCT 家族的转录因子,同样属于 CMF 亚家族的成员。目前研究者对已克隆的 CCT 基因家族中大部分成员进行了深入的功能解析,这些基因一般通过调控抽穗关键基因 *Hd3a* 和 *Ehd1* 影响水稻的开花抽穗过程^[22-24]。本研究对 *Os01g61900* 基因开展了部分研究工作,其中亚细胞定位分析结果显示该基因编码一个核蛋白;同时本研究经过原核表达及纯化获得了对应的重组蛋白,这为后续该基因下游调控基因的研究奠定了基础,也为全面解析该基因的功能的和它参与抽穗期分子调控的机制提供了可能。

参考文献:

- [1] 蒋丹,洪广成,陈倩,等. 水稻抽穗期分子调控研究进展[J]. 分子植物育种,2019,17(21):7071-7077.
JIANG D, HONG G C, CHEN Q, et al. Research progress in molecular regulation of heading date in rice (*Oryza sativa*) [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(21): 7071-7077.
- [2] PUTTERILL J, ROBSON F, LEE K, et al. The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors[J]. Cell, 1995, 80(6): 847-857.
- [3] STRAYER C, OYAMA T, SCHULTZ T F, et al. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog[J]. Science, 2000, 289(5480): 768-771.
- [4] ROBSON F, COSTA M M, HEPWORTH S R, et al. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2001, 28(6): 619-631.
- [5] COCKRAM J, THIEL T, STEUERNAGEL B, et al. Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the Poaceae[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45307.
- [6] KACZOROWSKI K A, QUAIL P H. *Arabidopsis* PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock[J]. The Plant Cell, 2003, 15(11): 2654-2665.
- [7] ZOBELL O, COUPLAND G, REISS B. The family of CONSTANS-like genes in *Physcomitrella patens* [J]. Plant Biology, 2005, 7(3): 266-275.
- [8] NAKAMICHI N, KITA M, ITO S, et al. The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function[J]. Plant & Cell Physiology, 2005, 46(4): 609-619.
- [9] SALOMÉ P A, MCCLUNG C R. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock[J]. The Plant Cell, 2005, 17(3): 791-803.
- [10] ONOUCHI H, IGENO M I, PÉRILLEUX C, et al. Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes[J]. The Plant Cell, 2000, 12(6): 885-900.
- [11] MIZUNO T, NAKAMICHI N. Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs) [J]. Plant & Cell Physiology, 2005, 46(5): 677-685.
- [12] TAMAKI S, MATSUO S, WONG H L, et al. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice[J]. Science, 2007, 316(5827):

- 1033-1036.
- [13] ITOH H, NONOUE Y, YANO M, et al. A pair of floral regulators sets critical day length for Hd3a florigen expression in rice [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(7): 635-638.
- [14] KOMIYA R, IKEGAMI A, TAMAKI S, et al. Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice [J]. *Development*, 2008, 135(4): 767-774.
- [15] KOMIYA R, YOKOI S, SHIMAMOTO K. A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice [J]. *Development*, 2009, 136(20): 3443-3450.
- [16] OGISO-TANAKA E, MATSUBARA K, YAMAMOTO S, et al. Natural variation of the RICE FLOWERING LOCUS T1 contributes to flowering time divergence in rice [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e75959.
- [17] ZHAO J, CHEN H Y, REN D, et al. Genetic interactions between diverged alleles of Early heading date 1 (Ehd1) and Heading date 3a (Hd3a)/RICE FLOWERING LOCUS T1 (RFT1) control differential heading and contribute to regional adaptation in rice (*Oryza sativa*) [J]. *The New Phytologist*, 2015, 208(3): 936-948.
- [18] TAKAHASHI Y, SHIMAMOTO K. Heading date 1 (Hd1), an ortholog of *Arabidopsis* CONSTANS, is a possible target of human selection during domestication to diversify flowering times of cultivated rice [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2011, 86(3): 175-182.
- [19] YANO M, KATAYOSE Y, ASHIKARI M, et al. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene CONSTANS [J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(12): 2473-2484.
- [20] REDDY B J, BARADKAR S M, MANOGNA T V S S, et al. A single-base deletion in exon 2 of Hd1 delineates monogenic recessive photoperiod insensitivity in aromatic Joha rice; a novel allele for seasonal adaptability [J]. *Biological Research*, 2024, 57(1): 94.
- [21] FAN X W, WANG P F, QI F X, et al. The CCT transcriptional activator Ghd2 constantly delays the heading date by upregulating CO3 in rice [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(10): 755-764.
- [22] LU L, YAN W H, XUE W Y, et al. Evolution and association analysis of Ghd7 in rice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e34021.
- [23] XUE W Y, XING Y Z, WENG X Y, et al. Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice [J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(6): 761-767.
- [24] YANG L, LIU T Y, LI B, et al. Comparative sequence analysis of the Ghd7 orthologous regions revealed movement of Ghd7 in the grass genomes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50236.
- [25] MISHRA M, RATHORE RS, BAGRI J, et al. The key contribution of OsGHD7 in controlling flowering time, grain yield, and abiotic stress tolerance in photoperiod-insensitive rice [J]. *Physiologia Plantarum*, 2024, 176(6): e14632.
- [26] WEN X X, ZHONG Z Z, XU P, et al. OsCOL5 suppresses heading through modulation of Ghd7 and Ehd2, enhancing rice yield [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2024, 137(7): 162.
- [27] LIU T M, LIU H Y, ZHANG H, et al. Validation and characterization of Ghd7.1, a major quantitative trait locus with pleiotropic effects on spikelets per panicle, plant height, and heading date in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(10): 917-927.
- [28] MATSUSHIKA A, MURAKAMI M, ITO S, et al. Characterization of Circadian-associated pseudo-response regulators; I. Comparative studies on a series of transgenic lines misexpressing five distinctive PRR Genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(2): 527-534.
- [29] YAN W H, LIU H Y, ZHOU X C, et al. Natural variation in Ghd7.1 plays an important role in grain yield and adaptation in rice [J]. *Cell Research*, 2013, 23(7): 969-971.
- [30] DOI K, IZAWA T, FUSE T, et al. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1 [J]. *Genes & Development*, 2004, 18(8): 926-936.
- [31] LI S L, HU Y, AN C, et al. The amino acid residue E96 of Ghd8 is crucial for the formation of the flowering repression complex Ghd7-Ghd8-OsHAP5C in rice [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(4): 1012-1025.
- [32] YOO S K, CHUNG K S, KIM J, et al. CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(2): 770-778.
- [33] DATTA S, HETTIARACHCHI G H C M, DENG X W, et al. *Arabidopsis* CONSTANS-LIKE3 is a positive regulator of red light signaling and root growth [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(1): 70-84.
- [34] ITO S, KAWAMURA H, NIWA Y, et al. A genetic study of the *Arabidopsis* circadian clock with reference to the TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1) gene [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2008, 50(2): 290-303.

- [35] NEMOTO Y, NONOUE Y, YANO M, et al. Hd1, a CONSTANS ortholog in rice, functions as an Ehd1 repressor through interaction with monocot-specific CCT-domain protein Ghd7[J]. *The Plant Journal*, 2016, 86(3): 221-233.
- [36] ZHANG J, FAN X W, HU Y, et al. Global analysis of CCT family knockout mutants identifies four genes involved in regulating heading date in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(5): 913-923.

Bioinformatics and Expression Analysis of Rice Gene *Os01g61900*

LI Yuntong, WU Yuanyuan, LI Cuiping, FENG Xiaoqin, LI Xiaowei, LI Ming,

NAN Wenbin, LIANG Yongshu, ZHANG Hanma, QIN Xiaojian

(Chongqing Key Laboratory of Plant Environmental Adaptation Biology,

College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: The rice (*Oryza sativa*) gene *Os01g61900* encodes a protein containing a CCT domain. Members of this gene family are predominantly involved in regulating flowering time and thus influence heading date and final yield formation in rice. Bioinformatic analysis, subcellular localization, tissue-specific expression profiling, and prokaryotic expression vector construction were conducted for *Os01g61900*, followed by prokaryotic induction and purification of its recombinant protein. Key findings include: 1) *Os01g61900* encodes a nuclear-localized CCT transcription factor with two distinct α -helical structures in its core domain. Homologs of this gene were identified in grape (*Vitis vinifera*, two homologs), *Arabidopsis thaliana*, maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*), *Brachypodium distachyon*, and *Populus trichocarpa*. Phylogenetic analysis revealed that *Os01g61900* clusters with homologs from maize, *B. distachyon*, and sorghum. 2) *Os01g61900* exhibited higher expression levels in roots and panicles of rice. 3) Subcellular localization assays via protoplast transformation and tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell transfection confirmed nuclear localization of the encoded protein. 4) A prokaryotic expression system was successfully established, enabling the production and purification of recombinant *Os01g61900* protein *in vitro*. These results lay a foundation for further functional characterization of *Os01g61900* and its molecular mechanism in regulating rice heading date.

Keywords: rice; heading date; subcellular localization; prokaryotic expression; protein purification

(责任编辑 方 兴)