

千代田草莓乙烯受体 *Etr2* 基因克隆及序列分析

宋春丽¹, 马俊莲², 唐霞², 张子德², 刘永巨²

(1. 河北农业大学 中兽医学院, 河北 定州 073000; 2. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 克隆了与草莓成熟有关的乙烯受体 *FaEtr2* 基因片段, 为进一步研究 *FaEtr2* 基因功能并通过基因技术改善草莓贮运性能奠定基础。以千代田草莓成熟果实中分离到的基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增到 1 条约 1.0 kb 的特异片段, 将该片段克隆到 pGEM-T easy vector 上经测序分析, 基全长共 1 049 bp, 编号 349 个氨基酸残基。序列分析结果表明, 该序列与 Chandler-*Etr2* 的 cDNA 序列同源性 99%、氨基酸序列同源性为 98%。

关键词: 草莓; 乙烯受体; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S668.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0046-04

Cloning and Sequence Analysis of a DNA Encoding Ethylene Receptor *Etr2* from Chiyoda Strawberry

SONG Chun-li¹, MA Jun-lian², TANG Xia², ZHANG Zi-de², LIU Yong-ju²

(1. College of Chinese Veterinary, Agricultural University of Hebei, Dingzhou 073000, China;

2. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In this study a ripening related ethylene receptor *etr2* gene in strawberry fruits was cloned for the following up research on gene function and improving varieties of strawberry through transgenic technology. A pair of primers were designed and synthesized based on the sequence reported of Chandler-*Etr2*. Using genome DNA extracted from Chinyoda strawberry mature fruits as template the specific PCR product of *etr2* was obtained, then it was ligated to pGEM-T easy vector and sequenced. The sequencing data showed that the PCR product was 1 049 bp encoding 349 predicted amino acid residues. Comparison with the cDNA sequence from Chandler-*etr2* indicated the homology was 99%, and amino acid identities were 98%.

Key words: Strawberry; Ethylene receptor; Gene clone; Sequence analysis

草莓(*Fragaria* × *ananassa* Duch.) 是深受人们喜爱的大众果品, 但果实采后易软化, 极大的影响了其商业价值。草莓属非跃变型果实, 但它也可以产生少量乙烯。2 种 ACC 氧化酶(*FaACO1* 和 *FaACO2*) 和 3 种乙烯受体(*FaEtr1*, *FaErs1*, *FaEtr2*) 基因已被克隆^[1]。其中, 属于系统 II 的 *FaEtr2* 在果实成熟过程中大量表达, 该乙烯受体有退化的组氨酸激酶结构域, 推断有少量乙烯就可能启动与草莓成熟相关的生理反应^[2]。因此, 采用反义 RNA 或 RNA 干扰技术将 *Etr2* 基因反向导入草莓植株中, 可在一定程度上抑制其内源 *FaEtr2* 基因的表达, 抑制乙烯信号向下游转导, 进而延缓草莓果实的软化, 使其贮藏期得以延长。本研究采用 PCR 技术克隆了全明星草莓 *Etr2* 基因片段并进行了序列分析, 为通过转基因技术抑制草莓成

熟软化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 千代田草莓成熟果实, 取自满城县草莓基地。

1.1.2 质粒载体和细菌菌株 pGEM-T 克隆试剂盒为北京 TIANGEN 公司产品, 购自保定赛尔克生物技术有限公司; 大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。

1.1.3 试剂盒、工具酶及生化试剂 胶回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶及 PCR 相关试剂购自天为时代生物公司; 各种限制性内切酶均为大连宝生物公司产品。

收稿日期: 2008-08-03

基金项目: 河北省科技攻关项目(04395501D-3)

作者简介: 宋春丽(1975-), 女, 河北沧县人, 讲师, 博士, 主要从事果蔬生物技术研究。

通讯作者: 马俊莲(1964-), 女, 山西太原人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事果蔬生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 PCR 扩增所用引物是根据 GenBank 中登陆的草莓 *Etr2* 基因的保守区设计的, 上游引物为: 5'-TGCTTACCAAGAGATTGG-3', 下游引物为: 5'-ATCAATGCTCCCTGACTTCC-3', 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 采用热启动 PCR 扩增目的片段, 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 56.1℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 5 min。同时以无菌水为模板做阴性对照。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的条带, 用 DNA 回收试剂盒回收。

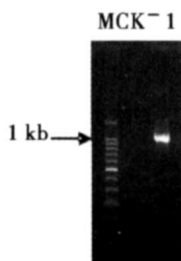
1.2.2 目的片段的克隆与序列的测定 纯化的目的 PCR 片段与 pGEM-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 在 X-gal/ IPTG 培养基上挑取白色菌落, 碱法小批量抽提质粒, 用 *EcoR* I 酶切质粒后, 电泳鉴定并选择插入片段大小正确的质粒, 菌液送北京三博远志生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 序列同源性分析 对测序结果进行 Blast 同源性比较, 用 Omega 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 电泳检测 PCR 产物

草莓基因组 DNA 经 PCR 扩增, 根据引物在 *Etr2* 基因上的位点, 可以推断出扩增产物应在 1 kb 左右。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后可以看出, 其扩增片段的大小约为 1.0 kb, 与我们预期大小一致, 凝胶成像系统观察电泳图谱, 如图 1。



M. 100 bp DNA Ladder Marker; CK⁻. 阴性对照; 1. PCR 产物。

M. 100 bp DNA Ladder Marker; CK⁻. Negative comparison;

1. PCR products.

图 1 PCR 产物电泳检测

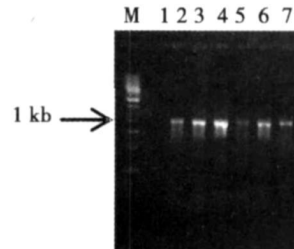
Fig. 1 Agrose gel electrophoretogram of PCR products

2.2 阳性克隆的鉴定

将扩增的片段纯化后与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌感受态 DH5α, 蓝白斑筛选含有插入片段的重组质粒。挑取 X-gal/ IPTG 培养基上白色菌落, 进行菌液 PCR 扩增。若含有插入片段则应扩增出一条约 1.0 kb 条带, 电泳检测 PCR 产物(图 2)。

采用碱裂解法小量提取质粒 DNA, 根据载体上

多克隆位点 2 端的酶切位点, 选择 *EcoR* I 酶切重组质粒。若重组质粒含有插入片段, 则酶切后除应得到 1 条 3.0 kb 的 pGEM-T 载体片段外, 还应有 1 条 1.0 kb 左右的插入片段。琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 结果与预期一致, 表明有 1.0 kb 左右的 DNA 片段插入到了 pGEM-T 载体, 此片段可能为我们所要的目的片段, 酶切电泳如图 3。



M. 1 kb DNA Ladder Marker; 1. 阴性对照;

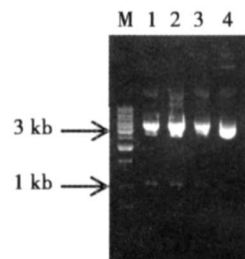
2~ 6. 菌液 PCR 产物; 7. 阳性对照。

M. 1 kb DNA Ladder Marker; 1. Negative comparison of PCR products;

2~ 6. PCR products; 7. Positive control.

图 2 菌液 PCR 产物电泳检测

Fig. 2 Agrose gel electrophoretogram of PCR products



M. 1 kb ladder Marker; 1~ 3. 重组质粒 *EcoR*I 酶切产物; 4. 重组质粒。

M. 1 kb ladder Marker; 1~ 3. Recombinant plasmid digested by *EcoR*I ;

4. Recombinant plasmid.

图 3 重组质粒经 *EcoR*I 酶切后电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid digested by *EcoR*I

2.3 阳性克隆的测序及同源性分析

将经检测正确的阳性克隆送北京三博远志生物技术有限公司进行测序。测序结果表明, PCR 扩增产物长 1 049 bp, 含有扩增时所用的引物序列, 不含内含子序列, 图 4 所示。

对克隆到的核苷酸序列进行同源性分析, 通过 NCBI 网站进行 Blastn 比较, 在 GenBank + EMBL + DDBJ+ PDB 数据库中显示出各种植物乙烯受体基因核苷酸序列, 它与 Chandler *Etr2* 的 mRNA 编码序列(登陆号为 AJ297513)同源性高达 99%, 除外引物序列只有 8 个核苷酸与其不同(图 4)。克隆的核苷酸序列编码 349 个氨基酸, 在氨基酸水平上, 它与 Chandler *Etr2* 氨基酸(登陆号为: CAC48386. 1)有 98% 的同源性。氨基酸序列只有 5 个不同(图 5)。因此可确定重组质粒插入的 DNA 片段为草莓 *Etr2* 基因片段, 即 Chiyoda *Etr2*。由上可见, Chiyoda *Etr2* 与 Chandler *Etr2* 无论是核苷酸水平还是在氨基酸水

千代田	TCGTTACCCAAGAGATTGCGAAGTCCCTTGATAGACATCAATATTGTCCACAACCCCTT	60
Chandler	TCGTTACCCAAGAGATTGCGAAGTCCCTTGATAGACATCAATATTGTCCACAACCCCTT	1 078
千代田	TTGAGCTATCTGAGACATTGGGTTTGAGTACTGTGCAGTTTGGATGCCTAATGAAATTA	120
Chandler	TTGAGCTATCTGAGACATTGGGTTTGAGTACTGTGCAGTTTGGATGCCTAATGAAATTA	1138
千代田	AAACGAGATGATCCTGACCCATGAGTTGAAAGGGAAGAACTATTCTAATATGTACAAC	180
Chandler	AAACAGAGATGATCCTGACCCATGAGTTGAAAGGGAAGAACTATTCTAATATGTACAAC	1 198
千代田	TTTCTATACCAATTGGCGATCCAGATGTTGTACTTATTAAGGGAGTGATGGGGTCAACA	240
Chandler	TTTCTATACCAATTGGCGATCCAGATGTTGTACTTATTAAGGGAGTGATGGGGTCAACA	1 258
千代田	TTCTTCGGCCAGATTGAGCACTTGTATGTGGAAGCAGTGGTGATTCTGGTGAGCCGGGAC	300
Chandler	TTCTTCGGCCAGATTGAGCACTTGTATGTGGAAGCAGTGGTGATTCTGGTGAGCCGGGAC	1 318
千代田	CAGTAGCTGCAATTGCGATGCCAATGCTTCGGGTTTCAATTTTAAAGGGGGGACTCCTG	360
Chandler	CAGTAGCTGCAATTGCGATGCCAATGCTTCGGGTTTCAATTTTAAAGGGGGGACTCCTG	1 378
千代田	AGTTGATCCAGACTTGTATGCGATATTGGTTCTGGTTCTACCTGGTGGAGAGCCTAGAT	420
Chandler	AGTTGATCCAGACTTGTATGCGATATTGGTTCTGGTTCTACCTGGTGGAGAGCCTAGAT	1 438
千代田	CTTGGAGCGTCAGGAACCTTGAGATAATTAAGGTGGTTGCTGACCAGGTGGCTGTGGCCT	480
Chandler	CTTGGAGCGTCAGGAACCTTGAGATAATTAAGGTGGTTGCTGACCAGGTGGCTGTGGCCT	1 498
千代田	TATCCCATGCTGCAATCCTTGAAGAGTCCCAACTTATGCGGGAACAATTGGCTGAGCAAA	540
Chandler	TATCCCATGCTGCAATCCTTGAAGAGTCCCAACTTATGCGGGAACAATTGGCTGAGCAAA	1 558
千代田	ACCGGGCCTTGCAACAGGCGAAAATGAATGCCATGATGGCAAGCCATGCAAGAACTCA	599
Chandler	ACCGGGCCTTGCAACAGGCGAAAATGAATGCCATGATGGCAAGCCATGCAAGAACTCA	1 617
千代田	TTCCAAAAGGTGATGAGTGATGGGATGAGAAGGCCAATGCATTGAGTATGGGGCTGCTT	659
Chandler	TTCCAAAAGGTGATGAGTGATGGGATGAGAAGGCCAATGCATTGAGTATGGGGCTGCTT	1 677
千代田	TCCATATGTCAGGATGAGAGTTGAAATAATGATCAGCGAGTTATTGTTGATGCAATGGTA	719
Chandler	TCCATATGTCAGGATGAGAGTTGAAATAATGATCAGCGAGTTATTGTTGATGCAATGGTA	1 737
千代田	AGGACAAGCAATGCTTATCGACGTTGATAAATGATGCTATGGATAATCCAGCCAAGGAT	779
Chandler	AGGACAAGCAATGCTTATCGACGTTGATAAATGATGCTATGGATAATCCAGCCAAGGAT	1 797
千代田	AGTGGAAGATTTCCTTTGGAGATGAGGCCCTTCCGGTTACAACCAATGATAAAGAAGCA	839
Chandler	AGTGGAAGATTTCCTTTGGAGATGAGGCCCTTCCGGTTACAACCAATGATAAAGAAGCA	1 857
千代田	GCTTGCCCTGCCAAATGCTTGTGTGTATAGGGGTTTGGTTTGCATTTGAGGTTGAC	899
Chandler	GCTTGCCCTGCCAAATGCTTGTGTGTATAGGGGTTTGGTTTGCATTTGAGGTTGAC	1 917
千代田	AAGTCCATAGCTGATCATGTAATTGGAGATGAAAGAAGGGTTTTTCAGGTGATTTTGCAT	959
Chandler	AAGTCCATAGCTGATCATGTAATTGGAGATGAAAGAAGGGTTTTTCAGGTGATTTTGCAT	1 977
Chandler	ATGGTTGGTAGCCTGTTGAATGGAAACAGGGCGGAGGGTTGGTCGTATTTCCGGTTTCT	1 019
千代田	ATGGTTGGTAGCCTGTTGAATGGAAACAGGGCGGAGGGTTGGTCGTATTTCCGGTTTCT	2 037
Chandler	TCAGAGAATGGAAGTCAGGGGAGGAATGAT	1 049
千代田	TCAGAGAATGGAAGTCAGGGGAGGAATGAT	2 067

横线处所标核苷酸序列为引物序列; 方框中的核苷酸为与 GenBank 中不同的核苷酸。

Underlined sequences were the primer sequences; Nucleotide in square box meant the nucleotide different from Chandler-Etr2.

图 4 千代田草莓 *Etr2* 核苷酸序列

Fig. 4 The nucleotide sequence of Chiyoda-Etr2

Chiyoda-Etr2	LTQEIRKSLD RHTILSTTLF ELSETLGLQY CAVWMPNEIK	40
Chandler-Etr2	LTQEIRKSLD RHTILSTTLF ELSETLGLQY CAVWMPNEIK	40
Chiyoda-Etr2	TEMILTHELK GKNYSNMYNF SIPIGDPDVV LIKSGDGVNI	80
Chandler-Etr2	TEMILTHELK GKNYSNMYNF SIPIGDPDVV LIKSGDGVNI	80
Chiyoda-Etr2	LRPDSALVCG SSGDSGEPPG VAAIRMPMLR VCNFRGGTPE	120
Chandler-Etr2	LRPDSALVCG SSGDSGEPPG VAAIRMPMLR VCNFRGGTPE	120
Chiyoda-Etr2	LIQTCYAILV LVLPGGEPRS WSGQLELEIK VVADQVAVAL	160
Chandler-Etr2	LIQTCYAILV LVLPGGEPRS WSGQLELEIK VVADQVAVAL	160
Chiyoda-Etr2	SHAAILEESQ LMREQLAEQN RALQQAQKMA MMASQARNSF	200
Chandler-Etr2	SHAAILEESQ LMREQLAEQN RALQQAQKMA MMASQARNSF	200
Chiyoda-Etr2	QKVMDSGMRR PMHSVGLLS IMQDESLNND QRIVVDAMVR	240
Chandler-Etr2	QKVMDSGMRR PMHSVGLLS IMQDESLNND QRIVVDAMVR	240
Chiyoda-Etr2	TSNVLSTLIN DAMDNPAKDS GRFPLEMRPF RLQPMIKEAA	280
Chandler-Etr2	TSNVLSTLIN DAMDNPAKDS GRFPLEMRPF RLQPMIKEAA	280
Chiyoda-Etr2	CLAKCLCVYR GFGFAIEVDK SIADHVIGDE RRVFQVILHM	320
Chandler-Etr2	CLAKCLCVYR GFGFAIEVDK SIADHVIGDE RRVFQVILHM	320
Chiyoda-Etr2	VGSLLNGNQG GGLVFRVSS ENGSQGRND	349
Chandler-Etr2	VGSLLNGNQG GGLVFRVSS ENGSQGRND	349

框中的氨基酸为两者不同的氨基酸。

The amino acid in square box meant the amino acid different from Chandler-Etr2

图 5 由 Chiyoda-Etr2 推导出的氨基酸序列及与 Chandler-Etr2 氨基酸序列同源性比较

Fig. 5 The amino acid sequence deduced from Chiyoda-Etr2 and homologous comparison with Chandler-Etr2

平, 都有很高的同源性, 可以认为两者在功能上也有很高的相似性。Chandler *Etr2* 基因已被证实在果实成熟阶段大量表达, 可能与成熟直接相关, 若将克隆的全明星草莓 *Etr2* 序列构建到植物表达载体, 以反义及 RNA 干扰技术抑制该基因的表达, 预期可能有效延缓草莓果实的成熟、软化。

3 讨论

分子生物学上有 2 种途径可以抑制乙烯作用, 一是抑制乙烯的生物合成, 二是抑制乙烯信号向下游转导。利用转基因技术可以从乙烯生物合成途径的下游抑制乙烯信号转导, 从而抑制乙烯作用^[3,4]。Chiyoda *Etr2* 与 Chandler *Etr2* 无论是核苷酸水平还是在氨基酸水平, 都有很高的同源性, 可以认为两者在功能上也是相似的。Chandler *Etr2* 基因已被证实与草莓果实成熟大量表达, 若将克隆的 Chiyoda *Etr2* 序列构建到植物表达载体, 以反义及 RNA 干扰技术

抑制该基因的表达, 预期可有效延缓草莓果实的成熟、软化。Chiyoda *Etr2* 的核苷酸序列已用于载体构建, 相关试验正在进行中。

参考文献:

- [1] Livio T, Anna P, Giorgio C. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: Does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(418): 2037–2046.
- [2] Cancel J D, Larsen P B. Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1557–1567.
- [3] Han Jicheng. Research progress on plant ethylene receptor and its transgene [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2004, 2(2): 157–163.
- [4] 魏绍冲, 陈昆松, 罗云波. 乙烯受体及其对果实成熟的调控 [J]. *园艺学报*, 2004, 31(4): 543–548.